SE PENSI DI NON AVER CAPITO QUALCOSA, NON PREOCCUPARTI. IN REALTA' NON HAI CAPITO UN CAZZO.

INTRODUZIONE

IMMUNITA': protezione individuale nei confronti delle malattie infettive, realizzata dal sistema immunitario, tramite una risposta immunitaria (serie ordinata di eventi)

IMMUNITA' INNATA – NATURALE - ASPECIFICA	IMMUNITA' ACQUISITA – ADATTATIVA - SPECIFICA
• Preesistente all'infezione • Risposta rapida (ore) • Indipendente dall'invasore • Non si evolve • Piccolo numero di recettori che riconoscono strutture condivise da un grande gruppo di patogeni; recettori codificati da geni ereditari • Cellule: fagociti (macrofagi e neutrofili), cellule dendritiche, natural killer e cellule linfoidi innate • Proprietà meccaniche e chimiche delle superfici, con sostanze antimicrobiche • Proteine del sangue (es. sistema del complemento) • Condivisa da tutti i pluricellulari (750 mln di anni)	• Compare dopo l'infezione • Risposta lenta (giorni) • Su misura per l'invasore, quindi potente • Diventa più rapida e più potente ad ogni nuovo contatto • Enorme numero di recettori che riconoscono ciascuno un antigene, cioè un motivo peptidico assolutamente specifico; recettori generati per ricombinazione somatica di segmenti genici • Cellule: linfociti • Linfociti distribuiti nei tessuti, in particolare negli organi linfoidi, e anticorpi circolanti • Presente solo nei vertebrati (300-350 mln di anni)

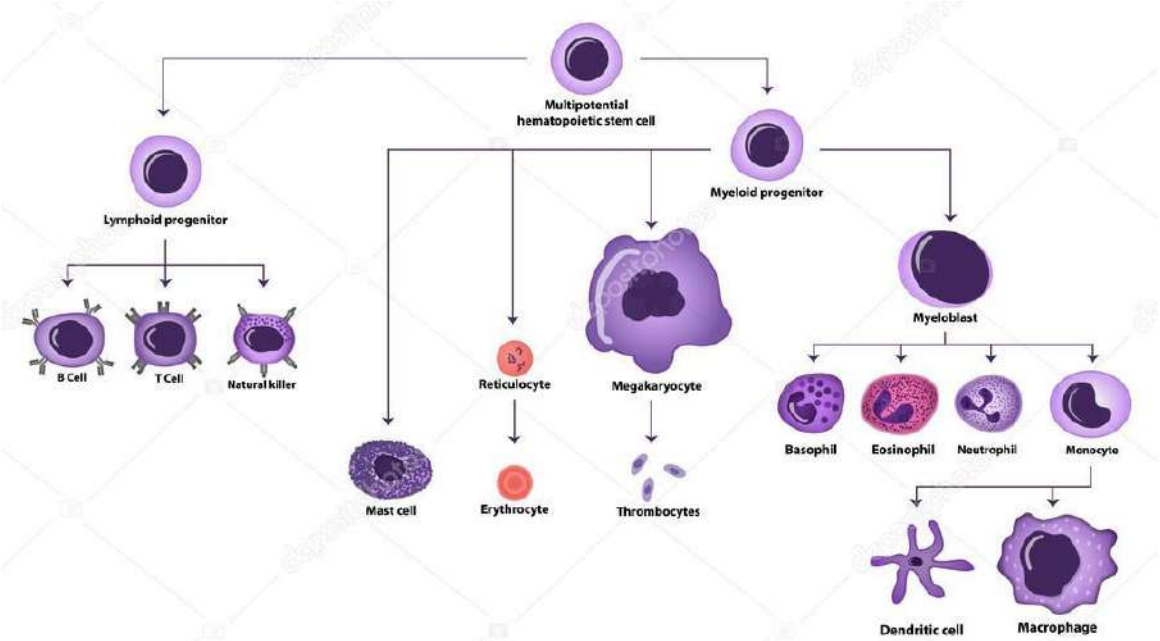
L'immunità adattativa si divide in 1- Immunità umorale: tramite elementi solubili, come gli anticorpi circolanti, efficace contro microrganismi e tossine extracellulari. 2- Immunità cellulare: tramite cellule, come i linfociti T, per i patogeni intracellulari inaccessibili agli anticorpi. Immunità attiva: acquisita in seguito al contatto con il patogeno (infezione) o l'antigene (vaccino), genera memoria. Immunità passiva: acquisita per trasferimento di un effettore (anticorpi o cellule) da un altro organismo (trasferimento adottivo), tramite plasma sanguigno o attraverso la placenta (IgG), non genera memoria.

Caratteristiche dell'immunità specifica:

1. **Specificità e diversificazione**: capacità di riconoscere regioni assolutamente specifiche di un antigene (epitopi) e capacità di riconoscere un numero elevatissimo di determinanti (10^7 – 10^9), detto repertorio linfocitario
2. **Memoria**: dopo l'infezione rimangono cellule memoria per una risposta secondaria più rapida
3. **Espansione clonale**: proliferazione delle cellule, identiche tra loro, per la risposta al patogeno
4. **Specializzazione**: la risposta cambia in base al patogeno, vengono ripetute quelle efficaci, i recettori si modificano per aumentare la propria affinità con l'antigene
5. **Risoluzione o auto-limitazione**: la risposta si spegne rapidamente alla fine dell'infezione, ripristinando una condizione di riposo detta omeostasi
6. **Non reattività verso il self (o tolleranza)**: in condizioni normali il SI non reagisce contro il self o contro antigeni non dannosi

Cellule del sangue: i leucociti sono circa 7400 per microlitro e si articolano in neutrofili (4400), linfociti (2500), monociti, eosinofili, basofili. La cellula staminale ematopoietica è detta emocitoblasto.

Sistema immunitario associato alla cute: cellule di Langherans, linfociti intraepidermici CD8+ γδ, linfociti dermici αβ effettori o della memoria, macrofagi. Sistema immunitario a livello delle mucose: cellule CD8+ nell'epitelio, linf T CD4+ e linf B nelle placche di Peyer, tutte le cellule immunitarie nella lamina propria.



TIPI DI RISPOSTA. Il patogeno penetra nell'epidermide → cellule di Langherans. Il patogeno sfrutta una ferita → il sangue che esce rende difficile al patogeno entrare, una volta nel sangue si attiva il complemento. Il patogeno entra nelle vie respiratorie → muco e ciglia lo intrappolano e lo portano fuori, i macrofagi alveolari puliscono gli alveoli. Patogeno invisibile (es. radiazioni) → heat shock protein, urato monosodico, proteine nucleari → infiammazione. Il patogeno inibisce la produzione di MHC I (es. virus) → linfociti NK. Invasione di un patogeno → febbre (mediata dall'ipotalamo). Legame patogeno – macrofago → fagocitosi, produzione di ipoclorito, ROS, ossido nitrico ed interleuchine, processazione ed esposizione dei peptidi del patogeno tramite MHC II.

HOMING LINFOCITARIO E RECLUTAMENTO LEUCOCITARIO. (homing=migrazione verso il tessuto infiammato, reclutamento=passaggio dal sangue al tessuto). I mastociti rilasciano istamina che causa vasodilatazione nell'arteriola, aumenta il flusso sanguigno (rossore), aumenta anche la pressione idrostatica per cui esce più liquido e piccole proteine: l'edema (gonfiore) ha lo scopo di concentrare gli elementi di risposta e trasportare gli antigeni al linfonodo. Nelle venule aumenta la permeabilità per contrazione delle cellule endoteliali, di conseguenza escono anche proteine più grandi (fra cui il complemento). Se un leucocito aderisse alla parete dei vasi a livello del capillare bloccherebbe la circolazione, quindi vi aderisce a livello della venula post-capillare. I focolai infiammatori sono caratterizzati da vasodilatazione e rallentamento del flusso ematico, quindi i linf si avvicinano all'endotelio (marginalizzazione). L'adesione è mediata da **selectine dell'endotelio**, che legano debolmente il leucocito, costringendolo a rotolare (**rolling**). Le selectine realizzano interazioni a bassa affinità con i carboidrati. Le cellule endoteliali attivate esprimono P (immagazinata in granuli, in risposta a istamina e trombina) e E-selectina (espressa più tardi, in risposta a citochine e TNF), che legano carboidrati sialilati complessi sui leucociti. I leucociti esprimono L-selectina, che lega sialomucine presenti sulle venule ad endotelio alto (per andare ai linfonodi). Mentre è a contatto con il tessuto il leucocita può percepirne le **chemochine**, che stimolano l'**attivazione delle integrine** e la produzione dei relativi ligandi. Le integrine sono proteine di membrana eterodimeriche (catena α e β) che legano uno specifico ligando con una testa globulare e trasducono il segnale attraverso il citoscheletro. Le integrine espresse dai leucociti legano molecole della superfamiglia delle Ig espresse dall'endotelio attivato: LFA-1 e Mac-1 legano le glicoproteine ICAM-1, 2 e 3 (espressi su leucociti ed endotelio); VLA-4 e α4β7 legano VCAM-1 (espressa dall'endotelio attivato). Attivazione dell'integrina: l'integrina in stato di bassa affinità presenta la testa

globulare ripiegata sulla membrana, ma in risposta a segnali intracellulari (legame con chemochine o antigene tramite TCR) la testa si dispiega aumentando la propria affinità per il ligando, inoltre aumenta l'aggregazione e quindi l'avidità di legame. L'adesione integrina-ligando permette l'appiattimento dei leucociti e la riorganizzazione del citoscheletro. L'espressione di integrine e dei loro ligandi aumenta per effetto delle citochine. Il legame stimola delle chinasi a modificare la VE-caderina, interrompendo le giunzioni endoteliali e permettendo la transmigrazione dei leucociti. E' stata osservata anche la migrazione trans-cellulare. La **combinazione selectina** – **chemochina** – **integrina** seleziona il leucocita adatto a quel preciso patogeno.

Le P-selectine sono lette preferibilmente dai neutrofili, mentre le E-selectine sono preferite dai monociti.

IMMUNITA' INNATA

1- opera la risposta difensiva iniziale che previene, controlla o elimina le infezioni
2- ha la funzione di eliminare le cellule danneggiate (da processi infettivi e non) e avvia la riparazione tissutale
3- stimola e influenza la natura e l'efficacia delle risposte adattative.

A. si avvale dell'infiammazione in presenza di infezioni, morte cellulare o accumulo di sostanze nei tessuti
B. tramite la difesa antivirale previene la replicazione virale e aumenta la suscettibilità delle cellule infettate all'uccisione da parte dei linf
C. meccanismi di difesa fisici e chimici limitano la diffusione di microbi attraverso le barriere epiteliali (cute e mucose) e nel sangue

CELLULE:

1- **Neutrofili**: leucociti polimorfonucleati contenenti granuli specifici (con lisozima, collagenasi, elastasi, defensine) e granuli azzurrofili (lisosomi con enzimi e sostanze microbicide). Sono i primi leucociti richiamati nel sito dell'infiammazione, muoiono in 1-2 giorni dal reclutamento. Uccidono i microbi per **fagocitosi** o per generazione del **NET, neutrophil extracellular traps**. Il NET è composto da filamenti di DNA e istoni a cui si lega il contenuto dei granuli, che intrappolano i microbi. Dopo aver estruso il NET i neutrofili muoiono e formano il pus.
2- **Monociti**: cellule circolanti che si differenziano in macrofagi, residenti nei tessuti. Precursori prenatali si differenziano in base all'organo: microglia (del SNC), cellule di Kuppfer (del fegato), osteoclasti, macrofagi alveolari, cellule di Langherans (dendritiche dell'epidermide, le uniche derivate da precursori embrionali), macrofagi sinusoidali (della milza). Nell'adulto l'M-CSF (monocyte colony stimulating factor) stimola l'espansione di colonie monocitiche. I monociti hanno granulazioni fini e si distinguono in **classici** (producono mediatori infiammatori) e **non classici** (riparazione tissutale successiva al danno). Vengono richiamati dopo i neutrofili nel sito dell'infiammazione e si differenziano in macrofagi, in situazioni infiammatorie i monociti possono differenziarsi anche in cellule dendritiche.
    - **Macrofagi**: cellule residenti nei tessuti che **fagocitano microbi e cellule morte** (apoptotiche e necrotiche), producono specie reattive dell'ossigeno ROS e dell'azoto e operano digestione proteolitica. Fungono da APC e secernono citochine per reclutare altri leucociti nel sito dell'infiammazione oppure per stimolare la crescita di nuovi vasi (angiogenesi) e di matrice extracellulare (fibrosi). Possiedono Toll-like receptors per rilevare le molecole attivatorie e recettori per le opsonine. Subiscono **attivazione classica** (miglioramento della fagocitosi, pro-infiammatoria) e **non classica** (rimodellamento tissutale, anti-infiammatoria). In seguito ad attivazione non classica producono fattori di crescita per fibroblasti e cellule endoteliali. Assumono varie forme e persistono per vari giorni. I macrofagi fungono da APC per i linf T effettori nel sito di infezione, e questi ne

aumentano la capacità fagocitica (immunità cellulo-mediata). Possiamo distinguere i macrofagi M1 che hanno un'attivazione classica (uccidono i microbi per fagocitosi), e macrofagi M2 che hanno un'attivazione alternativa (stimolano il rimodellamento e la riparazione tissutale) in base a quali citochine attivano il macrofago. Alcuni macrofagi possono fondersi diventando cellule giganti multinucleate che sono spesso presenti in alcuni tipi di infezioni microbiche (quella da micobatteri) o in risposta a corpi estranei.

- **Cellule dendritiche**: cellule con lunghe estrusioni della membrana e alta capacità fagocitica. Sono localizzate negli organi linfoidi, negli epiteli, nelle mucose e nel parenchima degli organi. Esprimono la più vasta gamma di TLR e PRR, la cui attivazione migliora la capacità di processare e presentare gli antigeni ed è seguita da produzione di citochine. Le **DC classiche o convenzionali** migrano nei linfonodi per presentare l'antigene ai linf T. Le **DC plasmacitoidi** reagiscono alle infezioni virali secernendo interferone di tipo I. Le **DC follicolari** sono una popolazione distinta di cellule che non derivano da precursori midollari, occupano i follicoli linfoidi e hanno il compito di captare antigeni opsonizzati da anticorpi e complemento e presentarli ai linf B, senza fagocitarli.

3- **Mastociti**: cellule residenti nella cute e negli epiteli delle mucose, attorno a piccoli vasi e nervi. Sono **rivestite da IgE** che, quando incontrano il proprio antigene, stimolano il **rilascio dei granuli** del mastocita, contenenti amine vasoattive (istamina, un vasodilatatore), enzimi proteolitici, mediatori lipidici (prostaglandine), citochine proinfiammatorie (TNF). Possiedono anche recettori TLR.

4- **Basofili ed eosinofili**: **granulociti** poco rappresentati contenenti granuli rispettivamente basofili ed acidofili. I primi sono circolanti e hanno le stesse funzioni dei mastociti, i secondi si trovano a livello delle mucose e contengono enzimi che danneggiano la parete cellulare dei parassiti. Alcuni eosinofili si trovano sempre nei tessuti dell'apparato respiratorio, urogenitale, gastrointestinale.

5- **Cellule linfoidi innate (ILC)**: derivano da precursori linfocitari del midollo e hanno meccanismi condivisi con i linf T (produzione di citochine), ma non esprimono TCR, i loro recettori non derivano da riarrangiamento genico e non subiscono espansione clonale e differenziazione. Ci sono tre gruppi di ILC che producono citochine analoghe ai linf T_H1, 2 e 17.
Le **cellule natural killer NK** (ILC di gruppo 1) sono linfociti privi di recettori per l'antigene. Sono il punto di giunzione tra immunità specifica e aspecifica. Hanno il compito di **uccidere cellule infettate** (da virus e batteri) **oppure tumorali** tramite liberazione di perforine e granzimi, che causano l'apoptosi delle cellule bersaglio, e produzione di IFN di tipo I. Sono il 10-15% delle cellule mononucleate presenti nel sangue e nella milza. Le funzioni delle NK dipendono dall'equilibrio tra i segnali di recettori attivatori (con motivi ITAM immunoreceptor tyrosin-based activation motifs, che attivano delle chinasi) e inibitori (con motivi ITIM immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif, che attivano delle fosfatasi). Gli attivatori riconoscono ligandi espressi da cellule danneggiate, infette o trasformate (tra cui le IgG opsonizzanti, che mediano citotossicità cellulare-anticorpo-dipendente), mentre gli inibitori riconoscono MHC di classe I, cioè interpretano la sua assenza come indicatore di danno (**riconoscimento del self mancante**). I recettori inibitori agiscono tramite reclutamento di fosfatasi e attenuazione della via di trasduzione. I geni recettoriali sono molto polimorfi e ogni NK ne esprime una combinazione variabile. Le citochine possono potenziare le risposte delle cellule NK.

6- **Linfociti T e B con recettori che riconoscono strutture conservate**: cellule NKT natural killer T (NK con recettori TCR alfabeta associate alle mucose), linf T $\gamma\delta$ e linf T $\alpha\beta$ intraepiteliali, linf B della zona marginale e linf B1.

7- **Barriere epiteliali**: la cute e le mucose generano una barriera fisica grazie alle strette connessioni tra cellule, alla cheratina, al muco (con glicoproteine appiccicose, le mucine), ai movimenti di espulsione (ciglia e peristalsi). Inoltre producono peptidi antimicrobici: le defensine e le catelicidine, che causano uccisione microbica e attivazione di altre risposte.

8- **Linfociti T $\gamma\delta$:** sono linfociti T che non riconoscono MHC, hanno funzioni helper e citotossiche. Hanno recettori relativamente poco diversificati in grado di riconoscere PAMP non solo proteiche. Riconoscono antigeni non peptidici presentati da CD1 (MHC non polimorfo).

RECETTORI DELL'IMMUNITA' INNATA:

Riconoscono circa 1000 molecole microbiche o prodotte da cellule danneggiate. Riconoscono i **PAMP, pathogens associated molecular patterns**, cioè molecole prodotte da specifiche classi microbiche: ss e ds RNA e DNA virale, elementi specifici (isole CpG), pilina e flagellina (batteri), lipopolisaccaride (gram -) e acido lipoteicoico (gram +), mannani (funghi e batteri) e glucani (funghi). Queste molecole sono generalmente essenziali alla sopravvivenza del patogeno. Riconoscono anche i **DAMP, damage associated molecular patterns**, molecole endogene prodotte da cellule danneggiate o morte: le HSP heat shock proteins, urato monosodico, oppure molecole responsabili della riparazione del genoma (HMGB). Esistono sia recettori cellulari (**PRR, Pattern recognition receptors**) sia proteine solubili per il riconoscimento di PAMP e DAMP. I PRR si trovano sulla membrana plasmatica, sulle vescicole fagocitiche e nel citosol.

- **TLR, toll-like receptors**: glicoproteine integrali di membrana con una regione extracellulare ricca in leucina e cisteina e un dominio intracellulare di omologia detto TIR per l'attivazione cellulare. Il primo scoperto era simile al recettore per IL-1, citochina pro-infiammatoria. Nell'uomo ci sono TLR da 1 a 9. Riconoscono PAMP di varie classi di patogeni e vari DAMP. Il legame è garantito dai moduli conservati ricchi di leucina e da residui variabili, che legano i PAMP direttamente o attraverso varie molecole adattatrici (ad esempio per l'LPS). Il legame causa la dimerizzazione (sia omo che eterodimeri) dei TLR. I TLR riconoscono microbi sia extracellulari sia intracellulari, perché sono sulla membrana plasmatica, sul reticolo endoplasmatico e sulle membrane endosomiali. La dimerizzazione ligando dipendente dei TLR causa il reclutamento di altre proteine con domini TIR, poi di chinasi che attivano fattori di trascrizione (NF-kB e IRF) per le risposte infiammatoria (IL-1 e TNF) e antivirale (interferone di tipo I). Il TLR-6, prodotto dal sito dell'infiammazione, stimola il fegato a produrre complemento, PCR (proteina c reattiva) e proteine dell'immunità innata. Il TLR-1 stimola la produzione locale di ROS.
- **PRR a livello citosolico**, con meccanismo uguale ai TLR: recettori NOD, recettori RIG e sensori di DNA citosolici.
- Altri recettori cellulari per i PAMP: 1- recettori per i carboidrati, come mannosio e dectine (funghi). 2- recettori scavenger, una famiglia variegata capace di legare lipoproteine ossidate e tanti altri PAMP. 3- recettori per i peptidi formilati (N-formil-metionina inizia la sintesi batterica), i chemoattrattanti più potenti per i leucociti, sono recettori accoppiati a proteine G.
- Il **recettore FC_ε** (fragment cristallizzable delle IgE) si trova su mastociti e basofili: lega le IgE che, quando incontrano il proprio antigene, portano alla degradazione della cellula, che libera i propri granuli, attaccando i parassiti (risposta T_H2). Il recettore FC_ε è costituito da due catene, α (corrispondente alla catena leggera delle Ig) e β(corrispondente alla catena pesante delle Ig), ciascuna con dominio costante e dominio variabile (come i TCR). La trasduzione è operata da motivi ITAM.
- **Recettore FC_γ** si trova sui fagociti per captare i microrganismi opsonizzati da IgG
- **CR1 e CR2**: recettori per le proteine del complemento.

MOLECOLE EFFETTRICI SOLUBILI. Agiscono opsonizzando il patogeno, aumentando la capacità fagocitica e richiamando altri fagociti, possono lisare direttamente il patogeno. Sono l'immunità umorale innata.

1- **COMPLEMENTO**. Il complemento si basa su una **cascata proteolitica** che amplifica enormemente il segnale. Il riconoscimento di molecole sulla superficie microbica avviene tramite via classica (C1q identifica anticorpi legati), via alternativa (C3 riconosce strutture come l'LPS e non rileva proteine inibitorie), via lectinica (lectina legante mannosio). Una volta attivato il complemento, si assembla la C3 convertasi, che taglia C3 in C3a (proinfiammatoria) e C3b, che opsonizza il patogeno e recluta la C5 convertasi, che taglia C5 in C5a (funzioni chemotattiche) e C5b, che recluta il complesso di attacco

alla membrana, capace di formare un poro nel patogeno, uccidendolo. Le membrane delle cellule animali possiedono inibitori del complemento e servono quantità maggiori per essere lisate.

2- **Pentrassine**: proteine pentameriche che attivano il complemento tramite la via classica, aumentano fino a 1000 volte la propria concentrazione durante le infezioni, per cui alcune fanno parte delle proteine di fase acuta. Sono pentrassine la PCR proteina C reattiva e la SAP sieroamiloide P.
3- **Collectine**: proteine trimeriche o esameriche con un dominio lectinico che lega i carboidrati, hanno funzione opsonizzante e attivano il complemento. Sono la MBL lectina legante il mannosio e le proteine surfattanti alveolari SP-A e SP-D. Le ficoline sono proteine simili capaci di legare carboidrati simili al fibrinogeno.

INFIAMMAZIONE (o flogosi). In seguito al rilevamento di PAMP e DAMP le cellule residenti in un tessuto producono segnali infiammatori che causano: 1- dilatazione arteriolare e aumento del flusso sanguigno. 2- aumento dell'adesività dei leucociti all'endotelio. 3- aumento della permeabilità dei capillari. L'arteriola si apre, il sangue entra, la pressione aumenta, l'acqua e alcuni soluti escono. A livello della venula aumenta la permeabilità, quindi escono cellule e proteine, che fanno aumentare la pressione oncotica del tessuto. L'aumento di pressione del tessuto, che tappa la venula, favorisce l'uscita di altro liquido. L'infiammazione si sviluppa in minuti/ore e persiste per giorni, e può diventare cronica (tessuto soggetto a rimodellamento, angiogenesi e fibrosi). Le **citochine infiammatorie IL-1, IL-6 e TNF** hanno effetto sia locale che sistemico. Tramite la sintesi di prostaglandine inducono l'ipotalamo ad aumentare la temperatura corporea (febbre) e inducono gli epatociti a produrre proteine di fase acuta. Se il patogeno resiste l'infiammazione può accanirsi e danneggiare i tessuti.

FAGOCITOSI. I fagociti esprimono recettori che riconoscono i microbi (TLR) oppure le opsonine (frammento Fc delle IgG) e rilevano varie citochine (IFN-γ). La membrana si invagina in un fagosoma, che si fonde ai lisosomi generando un **fagolisosoma**. In esso il patogeno è distrutto tramite una serie di meccanismi. L'ossidasi fagocitica usa il NADPH per generare specie reattive dell'ossigeno (burst respiratorio) e per generare l'ambiente ottimale per gli enzimi proteolitici (come l'elastasi e la catepsina G). Un enzima produce monossido di azoto NO che si può combinare ai ROS generando perossinitrito.

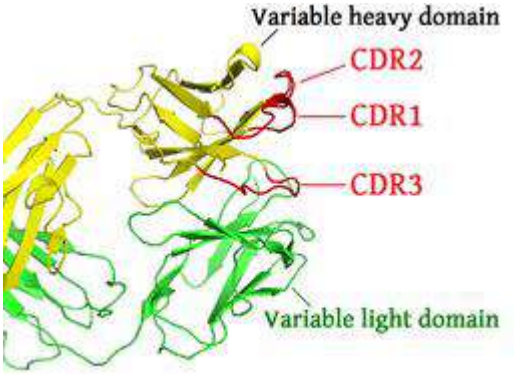
L'immunità innata amplifica e indirizza l'immunità adattativa: secondo l'**ipotesi del doppio segnale** l'immunità adattativa ha bisogno sia di riconoscere l'antigene, sia di rilevare la presenza di molecole indicatrici del danno in corso, come molecole costimolatorie, citochine, proteine del complemento. In particolare le citochine dell'immunità innata stimolano la proliferazione e il differenziamento dei linf. Per gli esperimenti sull'immunità adattativa sono necessarie molecole che simulino l'effetto di questi segnali: sono gli **adiuvanti** (es. prodotti che legano i TLR e composti dell'alluminio). Per evitare che le risposte innate causino danno ai tessuti intervengono **meccanismi inibitori** a feedback negativo (IL-10 inibisce la produzione di citochine pro-infiammatorie in maniera autocrina), inibizione competitiva (antagonista recettoriale dell'IL-1), autofagia (limitazione della secrezione) o tramite vie di segnalazione inibitorie.

IMMUNITA' SPECIFICA

RECETTORI PER L'ANTIGENE

Dominio immunoglobulinico: misura circa 110 aa, è costituito da 2 foglietti β di 3-5 nastri antiparalleli uniti da un ponte disolfuro, i nastri sono uniti tra loro da brevi anse, caratterizzate da altissima variabilità. La regione ipervariabile è costituita dalle anse delle regioni N-terminali, che costituiscono le **CDR (complementarity determining regions)**, 3 nella catena pesante / β, 3 nella catena leggera / α, di circa 10 aa

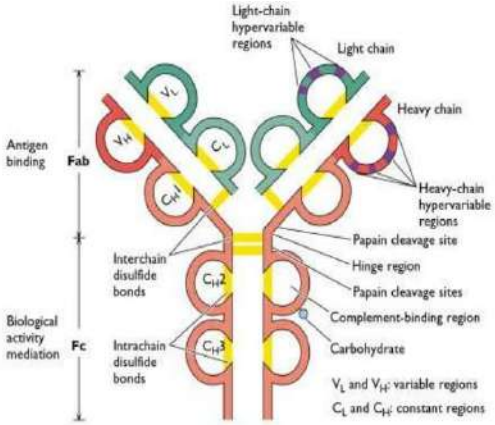
ciascuna. Le CDR formano una superficie piana che ospita l'antigene. CDR3 presenta la massima variabilità. CDR1 e CDR2 sono unite da ponti disolfuro.



Un **antigene** è una molecola che si lega ai recettori dei linfociti. Un **epitopo (o determinante antigenico)** è l'insieme di pochissime componenti di una macromolecola, che è l'antigene. Un antigene ha tanti epitopi, quindi dà origine ad una risposta policlonale, cioè mediata da tanti cloni linfocitari. Se l'anticorpo o l'antigene sono in eccesso si formano complessi solubili, mentre nella **zona di equivalenza** ogni Ab lega due Ag e ogni Ag è legato da più Ab, formando immunocomplessi insolubili che precipitano. Molti antigeni sono polimerici, quindi presentano lo stesso epitopo molte volte, per cui sono detti **polivalenti o multivalenti**. I determinanti sono lineari (sequenza aminoacidica), conformazionali (struttura 3D) o neoantigenici (in seguito ad una modifica).

IMMUNOGLOBULINE

Proteine del siero che rientrano nelle gamma-globuline. **Tetramero di due catene pesanti** (4-5 domini Ig ciascuna) **e due catene leggere** (2 domini Ig ciascuna), unite da ponti disolfuro, con forma a Y, **con due siti di legame per l'antigene**. Altissima specificità per l'antigene, affinità tra 10^-7 e 10^-11 M, che migliora ad ogni nuovo contatto con l'antigene. Il legame è di tipo sterico (chiave-serratura) e si avvale di legami non covalenti reversibili. Le proprietà biologiche dell'Ig sono stabilite dalla parte costante della catena pesante. Le differenze fra domini costanti dovute a polimorfismi sono allotipi, mentre le differenze nelle CDR sono idiotipi.



I B-cell receptors BCR sono le immunoglobuline di membrana associate alle proteine per la trasduzione del segnale. Riconoscono antigeni di ogni tipo, soprattutto grandi e polivalenti. I BCR sono associati a proteine transmembrana con motivi ITAM, **le Igα e le Igβ** (legate da un ponte disolfuro), per la trasduzione del segnale. Il corecettore che facilita la trasduzione è il recettore per le proteine del complemento di tipo 2 **CR2**, che riconosce il frammento C3d. L'attivazione dei linf B richiede l'**aggregazione (cross-linking)** di più recettori per l'antigene. L'aggregazione favorisce il reclutamento e l'attivazione delle chinasi della famiglia delle Src che fosforilano ITAM. Molecole piccole (es. frammenti monomerici), riconosciute dagli Ab ma incapaci di attivare i linf B, sono detti **apteni**. La via di trasduzione coinvolge tirosine chinasi che attivano numerose vie (Ras-MAP chinasi, fosfolipasi C, fattore NF-kB) tramite varie proteine adattatrici.

In base alla catena pesante dell'anticorpo si distingue la **classe (o isotipo) delle Ig: A - α; D - δ; E - Ɛ; G -γ ; M - μ**. Tutte le Ig possono essere sia di membrana, sia solubili, per splicing alternativo dello stesso trascritto (eliminazione della porzione transmembrana). Le IgM e IgD sono anticorpi di membrana del linf B vergine. In seguito allo switch isotipico anche IgA, E e G possono essere anticorpi di membrana. Le **IgD** hanno funzione ridondante rispetto alle IgM, knock out per IgD non hanno problemi. E' raro che le IgD siano secrete come anticorpi solubili. Le **IgM** solubili sono pentameri, attivano il complemento, i linf NK, i macrofagi. Hanno bassa affinità, ma con 10 siti di legame sono utili per legare antigeni polimerici (alta avidità di legame). **IgG (1-4)** attivano il complemento e possono opsonizzare il patogeno, fungendo da recettore per i macrofagi. Permangono nel sangue oltre 20-25 giorni (mentre l'emivita normale è di 3 giorni), grazie al recettore endosomiale FcRn che le capta e impedisce loro di dirigersi verso i lisosomi. Le IgG materne attraversano la placenta e proteggono il nascituro. I disolfuri di due catene pesanti γ possono ricombinarsi e formare IgG4

con 2 siti per l'antigene diversi tra loro (azione immunosoppressiva). Le **IgA (1-2)**, generalmente dimeri, diffondono nel muco e occupano i siti di legame dei patogeni per i loro target (epiteli e mucose). Le **IgE** sono stimolatori dell'infiammazione, ricoprono mastociti ed eosinofili e quando incontrano il proprio antigene stimolano il rilascio di Ca2+ e liberazione i granuli di istamina. Catene α e μ formano multimeri grazie alle catene j. Le catene leggere sono k (60%) oppure λ (40%).

Produciamo circa 3 grammi di Ig al giorno, abbondano in siero (1 g), secrezioni mucose (2 g) e nel fluido interstiziale (poco). Ricoprono i linfociti, i fagociti mononucleati eosinofili e i mastociti. Recettori dell'endotelio possono catturare le Ig e rimetterle in circolo, allungandone l'emivita.

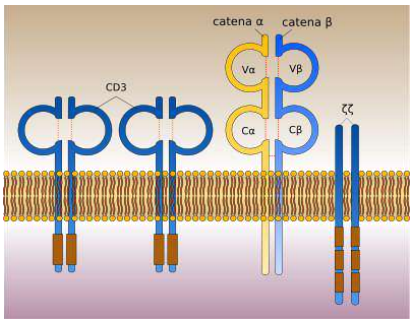
Affinità: forza di legame di ogni sito per il suo antigene. La cerniera flessibile (10-60 aa) tra domini costanti della catena pesante determina l'adattabilità e l'apertura massima dei bracci dell'Ig. **Avidità**: somma delle affinità di tutti i siti di legame (2, 4 o 10), considerando la flessibilità dei bracci. La scissione proteolitica delle cerniere con papaina genera un **Fc fragment cristallizable** costante (condiviso da tutti i cloni) e due **Fab fragment antigen** binding variabili (diversi per ogni clone) non funzionanti. La digestione con pepsina taglia al di sotto della cerniera, quindi porta alla degradazione dell'Fc e lascia un F(ab)2 funzionante.

Cross reattività: l'Ab può reagire contro bersagli diversi dal proprio. 1- se l'antigene è condiviso da più tipi cellulari o da specie distinte. (CD4 anche in cellule neurali, antigene di Forssman è sfingolipide in molti animali ma non l'uomo) 2- se lo stesso epitopo è condiviso da più antigeni (es. albumina umana e di scimpanzè sono simili, diverse da quelle di pollo) 3- se epitopi simili sono condivisi da più antigeni (affinità diversa). 4- se due epitopi chimicamente distinti assumono strutture simili. Un antigene molto importante è estremamente conservato, quindi non immunogeno. La cross-reattività può causare malattie autoimmuni (anticorpi anticellule nervose nella m. di Chagas da T. cruzi), è alla base di errori nelle tecniche analitiche immunologiche, ma può anche essere usata per la sierodiagnosi (siero umano con anticorpi contro antigene di Forssman prodotto dal virus della mononucleosi possono agglutinare emazie di pecore).

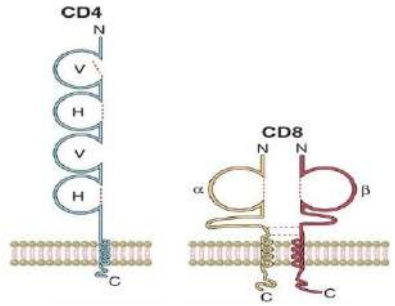
In base alla lunghezza della sequenza amminoacidica presente all'estremità carbossiterminale, gli anticorpi possono essere secreti oppure ancorarsi alla membrana del linfocita B. Le Ig secrete hanno una regione molto corta definita sequenza di coda, mentre le Ig associate alla membrana hanno due segmenti: una regione a α-elica idrofobica che è transmembrana, e una regione intracellulare composta da amminoacidi carichi positivamente che interagiscono con le teste negative dei fosfolipidi di membrana stabilizzando l'ancoraggio. L'attivazione dei linfociti B è potenziata da segnali generati da proteine del complemento attraverso il reclutamento di CD21, che fa da tramite tra l'immunità innata e quella specifica.

T-CELL RECEPTORS, TCR

Dimero con un solo sito di legame per l'antigene, che viene riconosciuto se e solo se presentato da una molecola MHC, i cui domini Ig sono riconosciuti dai corecettori CD4 e CD8. La mediazione dell'MHC impedisce che i TCR riconoscano antigeni solubili o direttamente sulla membrana dei microbi, ma rende necessario l'intervento di altre cellule. Altissima specificità per l'antigene, affinità tra 10^-5 e 10^-7 M, il tempo di contatto è breve (10 secondi). **L'antigene può essere solo un peptide** (10-20 aa). Gli epitopi riconosciuti sono sulla faccia opposta rispetto a quelli riconosciuti dall'MHC. I TCR sono costituiti da **due catene, α** (corrispondente della catena leggera delle Ig) **e β** (corrispondente della catena pesante delle Ig), ciascuna con dominio Ig variabile (con 3 CDR) e un dominio Ig costante, uniti da un ponte disolfuro. Strutturalmente il TCR è affine ad un Fragment antigen binding di un anticorpo. Dopo il primo incontro con l'antigene il TCR non cambia, quindi ha affinità minore rispetto al BCR. Le due catene sono unite da un ponte disolfuro extracellulare.



Sono associati in maniera non covalente (interazioni elettrostatiche nelle regioni transmembrana) a molecole per la trasduzione del segnale contenenti motivi ITAM, le CD3 e le ζ, identiche in tutti i linf T. Il complesso del TCR è costituito da un dimero αβ associato a **due eterodimeri CD3 γε e δε e un omodimero** ζζ. Se non ci sono tutte le catene il complesso TCR non viene esposto sulla membrana. Ogni catena CD3 possiede un dominio Ig e un motivo ITAM. CD3 è usato per riconoscere i linf T. Ogni catena ζ possiede 3 motivi ITAM. Ci sono anche **recettori costimolatori (CD28) e inibitori (CTLA-4)**. Il meccanismo di trasduzione si attiva solamente se il TCR riconosce un peptide non self. **I corecettori CD4 e CD8 determinano la risposta T helper o T citotossica**, perché il recettore TCR da solo non distingue tra antigeni intracellulari ed extracellulari. Il TCR riconosce primariamente l'MHC tramite CDR1 e CDR2, quindi riconosce l'antigene (solo 1 o 2 catene laterali) presentato tramite CDR3. Le altre molecole rivolte contro ligandi diversi dall'antigene, con funzione di adesione (LFA-1, CD-2), sono dette **molecole accessorie**, possono trasdurre segnali.



Si pensa che per l'attivazione sia necessario il cross-linking, cioè il riconoscimento di più epitopi adiacenti da parte di molti TCR, ma ogni APC espone meno di 100 MHC-peptide identici. Il riconoscimento del complesso induce cambiamenti conformazionali e determina la formazione della **sinapsi immunologica** (o SMAC, supramolecular activation cluster) **tra linf T e APC**. I corecettori CD4 e CD8 sono responsabili della restrizione per MHC, cioè del riconoscimento di una specifica forma allelica di MHC. **CD4** è un monomero con 4 domini Ig, di cui due legano i domini non polimorfi **α2 e β2 dell'MHC II**. **CD8** è un eterodimero αβ con un singolo dominio Ig per catena che lega i domini **α3 e β2-microglobulina dell MHC I**. Nell'attivazione vengono reclutate chinasi ZAP-70 ed Src che richiamano anche proteine adattatrici che formano il segnalosoma. CD4 e CD8 richiamano la chinasi Lck, importante per l'attivazione e la maturazione dei linf. CD45 è espressa da tutti i leucociti, il suo ligando è sconosciuto, ma è in grado di defosforilare Lrk attivandola. VLA-4 lega VCAM-1, espressa su cellule endoteliali attivate. Le molecole VLA legano anche fibronectina e laminina

I recettori si concentrano in zone della membrana detti raft lipidici o microdomini glicolipidici, dove ha inizio l'attivazione dei TCR e il riarrangiamento del citoscheletro. I recettori si concentrano quindi nel centro dello SMAC (15 nm), mentre le integrine (LFA-1 – ICAM -1) rimangono nelle regioni periferiche (40 nm) e stabilizzano l'interazione. La sinapsi immunologica garantisce contatti ripetuti e prolungati che superano la soglia di attivazione, nonostante ci siano pochi complessi MHC-peptide. La sinapsi permette inoltre il rilascio direzionato delle citochine e del contenuto dei granuli secretori verso l'APC o la cellula bersaglio. Infine il segnale viene spento per degradazione delle molecole, ubiquitinando la sinapsi.

Le proteine G stimolano tre diverse vie di MAP (mitogen-activated protein) chinasi, tramite le vie di Rac e di Ras, e attivano diversi fattori trascrizionali. Viene attivata anche la fosfolipasi C, che converte fosfatidilinositolo-4,5-bisP (PIP2) in diacilglicerolo (DAG) e inositolo-1,4,5-triP (IP3). IP3 è responsabile dell'aumento di [Ca++] nel linf T, mentre il DAG attiva la proteina chinasi C. Ciascuna via porta all'espressione di geni specifici tramite vari fattori trascrizionali, tra cui 3 fondamentali: NFAT Nuclear factor of activated T cells (attivato dalla calcineurina, porta all'espressione di IL2, IL4 e TNF), AP1 (si associa ad altri fattori trascrizionali) e NF-kB (omo o eterodimeri necessari per la trascrizione di citochine). L'attivazione dei linf T coinvolge anche i microRNA e il complesso RISC (RNA-induced silencing complex). Le tirosine fosfatasi reclutate dai motivi ITIM hanno generalmente effetto inibitore. Il recettore costimolatore **CD28 riconosce le molecole costimolatorie B7-1 e B7-2 prodotte dalle APC**. Altri recettori costimolatori (tra cui SLAM) appartengono alla famiglia CD2, che svolge sia adesione intercellulare (legame con LFA-3) sia trasduzione di segnale (collabora con CD28). **Il recettore inibitore CTLA-4 ha altissima affinità per B7-1** (superiore a CD28),

quindi se un linf T reg con CTLA-4 incontra una APC con l'antigene sequestra tutto il B7-1 e impedisce alla APC di attivare un linf T effettore autoimmune. CTLA-4 è espresso dai linf T recentemente attivati. Il linfocita CD4 attivato esprime il CD40 ligando e si lega al recettore CD40 della cellula APC. In questo modo APC espone più antigene e si attiva, se è un macrofago questo permette l'attivazione del macrofago (idem con tutte le altre cellule APC). CD28 causa la maggiore espressione di IL2, la maggior stabilità dell'RNA di IL2 e la produzione di Bcl-X.

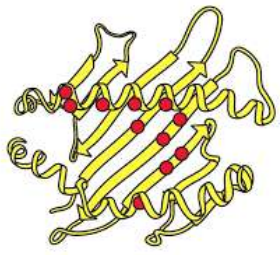
Alterazioni metaboliche in seguito all'attivazione dei linf T: si ha un aumentato trasporto di glucosio e il cambio di produzione di energia dalla fosforilazione ossidativa alla glicolisi aerobia (effetto Warburg), che preserva gli aminoacidi e i lipidi per le risposte linfocitarie. Si ha proliferazione cellulare, differenziazione dei linf T e produzione di citochine effettrici.

Ab contro CD3 precipitano tu>e le proteine del complesso. Un residuo di acido aspartico lega sia CD3 che ζ al TCR.

COMPLESSO MAGGIORE DI ISTOCOMPATIBILITA', MHC

Le molecole MHC sono codificate da geni Immune response Ir del locus MHC (cromosoma 6). Ci sono due classi di geni polimorfi, MHC I e MHC II, proteine strutturalmente distinte ma omologhe. Esistono oltre 5000 alleli per i geni MHC. Questi geni sono codominanti, cioè un individuo esprime gli alleli ereditati da entrambi i genitori. Il locus MHC misura 3500 kb e 4 cM e codifica per tre tipi di MHC I (HLA-A, B e C) e tre tipi di MHC II (HLA-DP, DQ, DR). Nella regione MHC II ci sono anche proteine coinvolte nel processamento di antigeni. Ci sono inoltre le cosiddette MHC III, che includono proteine del complemento e citochine.

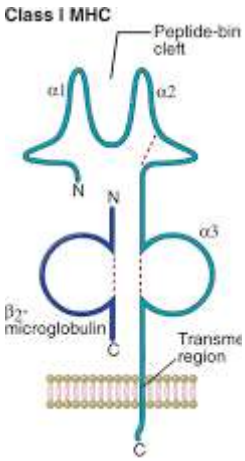
Eterodimero con una sola tasca di legame per l'antigene, seguita da due domini Ig (riconosciuti dai corecettori CD4 e CD8 e quindi altamente conservati). Affinità intorno a 10^-6 M. Sono detti anche HLA, sistema degli antigeni leucocitari umani. Possiedono due domini Ig, una regione transmembrana e un dominio intracitoplasmatico non trasduttore. Apparentemente sono dimeri, ma in realtà sono sempre trimeri: quando vengono prodotti legano nella tasca una terza catena fittizia, quando legano l'antigene vengono portate sulla membrana, senza peptide vengono internalizzate e distrutte. I linfociti di un individuo riconoscono solo i propri MHC. Bastano relativamente pochi complessi MHC – peptide (un centinaio, meno dello 0,1% delle MHC espresse da una APC) per attivare un linf T. L'MHC non discrimina tra self e non self, ma solo la presentazione di antigeni non self ha le caratteristiche necessarie per causare la risposta immune.



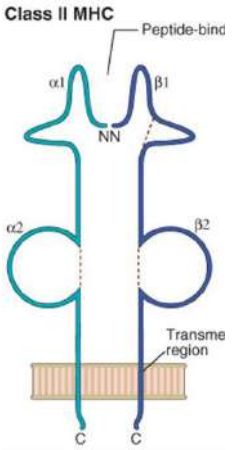
C'è una sola **tasca** (groove o solco) di legame per l'antigene **con residui polimorfici** sul pavimento, sulla parete e intorno alla tasca. La tasca, formata dalle regioni N-terminali, è costituita da una piastra di 8 filamenti beta che sostengono due alfa eliche. Le due alfa eliche sono uno dei punti riconosciuti dai TCR. I residui polimorfici determinano la diversità della tasca tra individui, quindi la diversa suscettibilità alle malattie. Le regioni polimorfiche sono responsabili della grande diversità dei peptidi esposti: gli MHC legano alcuni epitopi immunodominanti per ogni antigene, ma se quelli cambiano la risposta immunitaria non viene attivata e l'individuo muore. Chi invece riconosce il nuovo antigene sopravvive e traferisce alla progenie i geni necessari per presentare quell'antigene (plasticità della popolazione al patogeno).

I peptidi che si legano ad un tipo allelico di MHC condividono alcune caratteristiche comuni che ne garantiscono l'interazione, come dimensione e struttura. Una volta formato il complesso peptide – MHC è stabile e ha una lunga emivita (ore o giorni). La complementarietà è imperfetta e l'affinità di legame è bassa, ma il legame è durevole. I peptidi assumono nella tasca una **conformazione estesa** e formano legami non covalenti, generalmente interazioni elettrostatiche delle porzioni N e C terminale e altre interazioni tra residui àncora e le nicchie (idrofobiche, ioniche…) del pavimento beta. Ogni peptide presenta **1-2 residui ancora**, simili tra loro, mentre gli altri sono variabili. Peptidi nell'MHC II fanno legami H e ionici con le alfa-

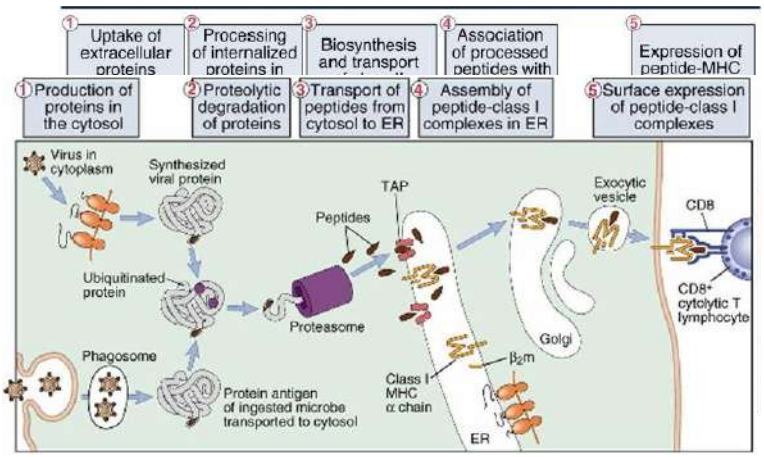
eliche laterali. Alleli MHC diversi permettono il legame a peptidi diversi, che vengono presentati e scatenano la risposta. Le proteasi generano tanti peptidi, di cui solo alcuni possiedono le caratteristiche adatte per legare le MHC, questi sono altamente immunogeni e vengono definiti epitopi immunodominanti o determinanti.



MHC di classe I: espresso da **tutte le cellule nucleate**, eterodimero costituito da una lunga catena pesante α che forma la tasca per l'antigene e da una corta β2 microglobulina con funzione strutturale, costituita da un dominio Ig interamente extracellulare, codificata al di fuori del locus MHC. **α1 e α2 costituiscono la tasca**, il dominio Ig α3 + β2 microglobulina è il sito di legame per CD8 (linf T citotossico). E' prodotto a partire da **6 alleli**, quindi una cellula può avere fino a 6 MHC I diversi. E' sintetizzato come dimero nei fagolisosomi. Espone **solo proteine derivate dal metabolismo interno della cellula**, cioè proteine presenti nel citosol (normali, virali, tumorali, ma anche di natura microbica, sfuggite ai fagosomi). Può ospitare circa **8-12 aa**. La sua produzione è aumentata da tutti i tipi di IFN. **Processazione**: 1- ubiquitinazione e demolizione nel proteasoma citosolico di polipeptidi difettosi e proteine danneggiate. Il proteasoma ha ampia specificità di substrato e può generare peptidi diversi in situazioni diverse (IFN → peptidi adatti all'MHC I) 2- trasporto nel reticolo endoplasmatico tramite TAP (trasportatore associato al processamento dell'antigene), un trasportatore eterodimerico di tipo ABC. TAP trasporta peptidi di misura e struttura ideale per l'MHC I. 3- caricamento dell'antigene sull'MHC I: TAP e MHC I vuoto sono messi a contatto dalla proteina tapasina. Queste proteine formano, insieme alle chaperonine per il ripiegamento dell'MHC, il complesso di caricamento del peptide. Il complesso garantisce una rapida cattura dei peptidi da parte delle MHC I 4- esposizione sulla membrana: in seguito al rimaneggiamento e al legame del peptide l'MHC I perde affinità per la tapasina, esce dal RE, migra attraverso il Golgi e viene trasportato da vescicole esocitotiche sulla membrana cellulare. La regione C-terminale della catena alfa possiede una porzione idrofobica transmembrana e termina con una porzione positiva.



MHC di classe II: espresso solo dalle **APC**, eterodimero composto da catene α e β, i cui segmenti **α1 e β1 formano insieme la tasca**, che quindi presenta maggiore diversità. Prodotto a partire da 6-8 alleli (coppie A e B per catene α e β, ci sono più geni DRB) per 3 loci (DP, DQ, DR), quindi un individuo può produrre **10-20 MHC II diversi**. E' sintetizzato come trimero, con la tasca occupata da una catena invariante che ancora l'MHC alla membrana. La tasca è aperta sul fondo, quindi può ospitare peptidi di **10 - 30 aa**. I domini Ig α2 e β2 sono riconosciuti da CD4 (linf T helper). La sua produzione è aumentata da IFNγ e da segnali dei Toll-like receptors. **Processazione**: 1- fagocitosi: l'MHC II espone proteine derivate da antigeni esterni, in certi casi anche proteine destinate alla secrezione o prodotti dell'autofagia. 2- digestione: fusione degli endosomi con gli antigeni ai lisosomi, generando fagolisosomi (oppure autofagosomi), in cui avviene la digestione proteolitica (operata da catepsine). 3- L'MHC II è sintetizzato nel RE e la tasca è occupata dalla **catena invariante**, un trimero che associa 3 MHC alla membrana e li dirige verso gli endosomi specializzati. Durante l'esocitosi questi endosomi si fondono con i fagolisosomi. 4- caricamento dell'antigene sull'MHC II: negli endosomi specializzati i peptidi proteolitici degradano la catena invariante lasciando un frammento di 24 aa, denominato CLIP. Nel compartimento è



presente un'altra HLA, HLA-DM, non polimorfa. HLA-DM funge da scambiatore di peptidi, rimuove CLIP dalla tasca per l'antigene e non viene esposta sulla membrana cellulare. Solo peptidi con affinità maggiore di CLIP possono legarsi alla tasca. I peptidi legati vengono tagliati fino alla dimensione appropriata. 5- esposizione sulla membrana delle MHC II - peptide.

TRASDUZIONE DEL SEGNALE

Ci sono varie classi di recettori che mediano risposte cellulari di vario tipo. I ligandi inducono l'aggregazione delle proteine recettoriali oppure la modificazione conformazionale del recettore. Spesso sono coinvolte modificazioni post traduzionali: aggiunta e rimozione di fosfato (chinasi e fosfatasi), ubiquitina, lipidi, gruppi acetile e metile. I recettori sono raggruppati nelle categorie: tirosine chinasi non recettoriali, recettori tirosinchinasi, recettori nucleari (per ormoni), recettori accoppiati alle proteine G, altri (recettori Notch: vengono clivati quando riconoscono il loro ligando e traslocano nel nucleo). Le molecole coinvolte nella trasduzione sono spesso **modulari** e si avvalgono di **proteine adattatrici** per la formazione di complessi. Tra i motivi della trasduzione ci sono motivi attivatori ITAM – immunoreceptor tyrosine-based activating motifs (la fosforilazione delle tirosine ne stimola l'attività chinasica) e motivi inibitori ITIM -immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (la fosforilazione delle tirosine richiama delle fosfatasi).

Il numero di recettori attivati modula l'intensità della risposta o discrimina tra risposte diverse. La modulazione è garantita dall'attivazione progressiva di motivi ITAM (in base alla forza e alla durata di legame o all'aggregazione di recettori), all'effetto di corecettori (CD4, CD8, CR2) o di recettori inibitori. La trasduzione è coadiuvata dai recettori costimolatori che percepiscono i secondi segnali, indipendenti dall'antigene ma dipendenti dal patogeno (il recettore dei linf T CD28 percepisce il costimolatore B7 prodotto dalle APC).

La risposta può essere attenuata tramite specifici recettori inibitori con motivi ITIM che reclutano fosfatasi. Anche le proteine E3 ligasi contribuiscono alla degradazione delle proteine della risposta. Tramite catene di poliubiquitina di tipo lisina-48 inviano le proteine al proteasoma, mentre con catene lisina-63 possono causare l'attivazione di NF-kB. Una singola ubiquitina è il segnale di internalizzazione e degradazione lisosomiale di proteine di membrana, come avviene per il TCR.

ANTIGEN PRESENTING CELLS

Dette anche cellule accessorie: cellule dendritiche, fagociti mononucleati, linfociti B, cellule endoteliali, epitelio timico. Le APC producono una serie di **secondi segnali** necessari per l'attivazione dei linf T, in particolare i costimolatori (molecole di membrana) e le citochine responsabili del differenziamento. Adiuvanti: sostanze proinfiammatorie dell'immunità innata che inducono le APC a produrre costimolatori. Bisogna iniettare un antigene insieme ad un adiuvante per avere una risposta immunitaria (vaccino). Recettori Toll-like e altri legano molecole microbiche e inducono l'APC ad aumentare l'espressione di MHC e costimolatori. L'efficienza è aumentata dai linf T helper stessi, che espongono il CD40 ligando e secernono IFNγ.

1- **Cellula dendritica**: esprime il costimolatore per **attivare il linf T vergine**, questo produce CD40 ligando, che stimola la DC a produrre più MHC II e più costimolatore, amplificando la risposta. Derivano da precursori midollari, tranne le cellule di Langherans, derivate da precursori embrionali. Ci sono **cellule dendritiche mieloidi convenzionali** che producono TNF e IL-6. In assenza di infezione e infiammazione la DC non esprime costimolatori e presenta antigeni tissutali a cloni di linf T autoreattivi, causandone l'inattivazione o la morte, o promuovendo la formazione di linf T regolatori. In presenza di DAMP la DC va incontro a **maturazione**, cioè espone segnali (B7, ICAM-1, IL-12) che stimolano la risposta da parte del linf T. Ci sono due tipi di DC convenzionali, il primo promuove le **risposte CD4+**, il secondo è efficiente nella cross-presentazione. Nella **cross presentazione** la DC

fagocita una cellula infettata da virus o una cellula tumorale, ne degrada gli antigeni e li espone sugli MHC I (insolito), in modo da stimolare i linf T CD8+ citotossici. Le **DC plasmacitoidi (o linfoidi)** assomigliano a plasmacellule e sono scarsamente fagocitiche, ma in seguito a riconoscimento di virus tramite TLR si differenziano in cellule con le caratteristiche di DC, (presentano antigeni virali a linf T specifici) e producono **IFN di tipo I**. Un cell dendritica immatura vive 10 ore, una matura vive 100 ore e continua ad accumulare MHC II. La DC matura perde adesività per gli epiteli ed esprime il recettore per le chemochine CCR7, che lo porta verso la zona T dei linfonodi. Contemporaneamente inizia a esprimere le molecole necessarie alla stimolazione dei linf T. Se sfrutta la pinocitosi la DC non ha bisogno di "riconoscere" l'antigene con recettori specifici. L'espressione di MHC aumenta in presenza di IFN. L'espressione di costimolatori è costitutiva e aumenta in presenza di IFN e CD40L.

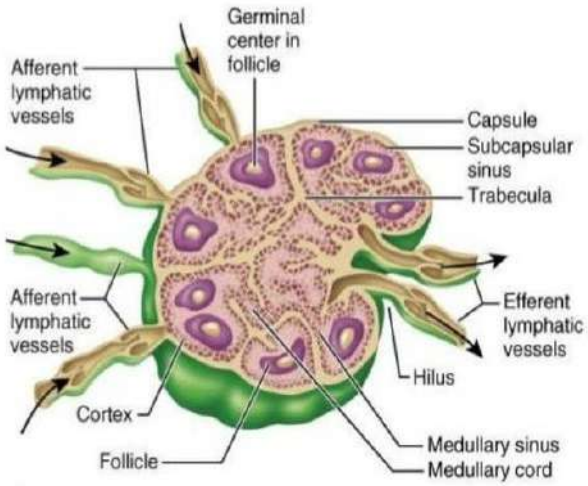
2- **Macrofago**: esprime il costimolatore per **attivare il linf T helper effettore**, non il linf T vergine. Riconosce le opsonine (IgG, complemento, proteina C reattiva) che circondano un patogeno e ne stimolano la fagocitosi. E' il meccanismo centrale dell'immunità cellulare (i linf T attivati stimolano a loro volta il macrofago) e dell'ipersensibilità di tipo ritardato. Ha bassi livelli di MHC, che aumentano in presenza di IFN. L'espressione di costimolatori è stimolata da LPS, IFN e CD40L.
3- **Linf B**: riconosce un antigene proteico e si attiva, poi **presenta l'antigene al linf T helper**. Il linf T helper produce citochine che stimolano il linf B a diventare plasmacellula che produce anticorpi in risposta ad **antigeni T-dipendenti**. La produzione di MHC aumenta per effetto di IL4. L'espressione di costimolatori è stimolata da linf T e dall'aggregazione di BCR.
4- **Cellule dell'endotelio vascolare**: esprimono MHC II se stimolate da IFN e possono reclutare e attivare linf T effettori nel corso delle risposte immunitarie cellulari. L'espressione di costimolatori è costitutiva.
5- **Cellule epiteliali timiche**: esprimono MHC II e operano il processo di selezione dei cloni T self/ non self.

ORGANI LINFOIDI

Negli organi linfoidi generativi (o primari o centrali) i linf esprimono i propri recettori e raggiungono la maturità fenotipica e funzionale. Negli organi linfoidi secondari (o periferici) hanno inizio le risposte agli antigeni.

1- **Midollo osseo**: si occupa dell'ematopoiesi dal 4° mese di gestazione in poi, soprattutto in quello delle ossa piatte. I precursori ematici maturano ed entrano nei sinusoidi del midollo rosso. Le **cellule staminali ematopoietiche** vanno incontro a divisione asimmetrica e generano progenitore linfoide e progenitore comune mieloide-megacariocitico-eritroide. Il microambiente necessario per l'ematopoiesi è ricco di citochine (come i fattori di stimolazione della crescita delle colonie). Nel midollo osseo sono localizzate plasmacellule a lunga vita, cellule B follicolari ricircolanti e alcuni linf T della memoria.
2- **Timo**: nella regione retrosternale di origine epiteliale, organo suddiviso in tanti lobuli, ciascuno con regione corticale e midollare. Nella zona corticale ci sono agglomerati di linf T e cellule epiteliali della corticale timica, che producono IL-7. Nella zona midollare ci sono macrofagi e cell dendritiche e cellule epiteliali midollari timiche, responsabili della presentazione di antigeni self ai linf T. **I timociti sono linf T a diversi stadi di maturazione, che comincia nella corticale e termina nella midollare**. Nella regione midollare ci sono i corpuscoli di Hassal, spirali di cellule in via di degenerazione. Dal timo escono vasi linfatici efferenti. Il timo si sviluppa dall'endoderma e subisce un'involuzione con l'età, quindi è quasi assente dopo la pubertà, sostituito da tessuto fibroadiposo. Il timo è necessario per la formazione delle venule ad endotelio alto.

3- **Sistema linfatico e linfonodi**: vasi specializzati che drenano i liquidi dai tessuti ai linfonodi e poi al sangue. Il flusso della **linfa** è permesso da una leggera pressione coadiuvata dalla spremitura esercitata dai tessuti, insieme ad un sistema di valvole. I vasi collegano un sistema di 500 linfonodi e infine confluiscono nel dotto toracico, che entra nella vena succlavia. Nella linfa si trovano cellule dendritiche con antigeni processati, antigeni e microbi solubili, mediatori solubili dell'infiammazione. Ogni linfonodo ha una collezione ristretta di linfociti, quindi un antigene deve attraversarli tutti. Un linfonodo ha struttura a fagiolo ricoperto da una **capsula** connettivale, che viene attraversata da **vasi afferenti**. Sotto alla capsula fibrosa ci sono i seni linfonodali: i capillari afferenti arrivano al **seno sottocapsulare** (o marginale), la linfa passa nel **seno midollare** e poi nei vasi linfatici efferenti. Nella **corticale esterna** ci sono i **follicoli**, ricchi di linf B. Il follicolo primario è omogeneo. In seguito al riconoscimento di un antigene si trasforma in follicolo secondario e sviluppa un **centro germinativo**, costituito da centroblasti (linf B in proliferazione, zona scura) e centrociti (linf B già selezionati da cell dendritiche, zona chiara). La **regione corticale parafollicolare** (o paracorticale, più profonda) è organizzata in cordoni e **ospita i linf T** (70% CD4+). In questa zona i fibroblasti reticolari formano i **condotti FRC** che collegano i seni linfonodali con i vasi sanguigni della midollare, le **venule ad endotelio alto** (HEV, caratterizzate da cellule endoteliali cubiche). I linf arrivano al linfonodo tramite le HEV, quindi si distribuiscono intorno ai condotti FRC o in base alle chemochine che rilevano. Microbi ed antigeni ad alto peso molecolare vengono catturati dai macrofagi del seno sottocapsulare e presentati ai linf B, mentre quelli a basso peso molecolare passano nei condotti FRC e vengono catturati per pinocitosi da cellule dendritiche, che li espongono ai linf T. Anche le cell dendritiche tissutali migrano attraverso la linfa fino alla zona T.



4- **Milza**: costituita da polpa rossa e polpa bianca. La milza riceve sangue dall'arteria splenica, che si divide a formare i sinusoidi vascolari che poi confluiscono nella vena splenica. I macrofagi **della polpa rossa** rimuovono dal sangue i globuli rossi (emocateresi), microbi opsonizzati e cellule danneggiate. Insieme al fegato può fungere da sede di ematopoiesi extramidollare in casi gravi. La **polpa bianca** si organizza attorno alle arterie centrali, le cui diramazioni sono circondate da un manicotto di linfociti T (**manicotti linfoidi periarteriolari**) e sboccano nel seno marginale. Tra il seno marginale e il manicotto ci sono strutture simili ai follicoli dei linfonodi (la milza ripete la struttura del linfonodo). I seni marginali sono così chiamati perché si trovano nella zona marginale, che fa da confine tra polpa bianca e polpa rossa. La zona marginale è ricca di linfociti B, detti per questo linfociti B della zona marginale, cha hanno un repertorio di antigeni meno vasto di quello dei linfociti follicolari.

5- **Tessuto linfoide associato alla cute e alle mucose (MALT)**: la pelle è pluristratificata e corneificata, quindi è protetta solo dalla cellule di Langherans. Il MALT comprende mucosa gastroenterica e bronchiale. La cavità orale e la laringo-faringe sono protette dall'anello del Waldayer (2 tonsille palatine, 1 linguale, 1 faringea), l'intestino dalle placche di Peyer. Questi sono organi linfoidi secondari veri e propri e producono soprattutto IgA. Nell'epitelio mucoso le cellule M catturano e portano gli antigeni verso i linfociti per evitare che questi debbano uscire nell'ambiente esterno. Questi tessuti possiedono sistemi linfonodali (capsulati e non) e sistemi cellulari propri per risposte specializzate.

6- Nella cute troviamo le cellule di Langerhans, poi tra i cheratinociti linfociti effettori intra-epidermici CD8+ con recettori γδ, linfociti effettori e memoria αβ sia CD4+ che CD8+ (che esprimono CLA-1), macrofagi.
7- Nell'epitelio delle mucose si trovano linf T CD8+, il 10% gammadelta. Nella lamina propria macrofagi, DC, helper attivati, plasmacellule, eosinofili, mastociti. Nelle placche del Peyer: cellule M, linf B, CD4+.

Gli effettori e i recettori dell'immunità innata sono in tutto il corpo, mentre l'immunità specifica è solo in alcuni distretti. Gli **organi linfoidi secondari servono a concentrare gli antigeni**: a livello dei capillari il plasma esce dai vasi, un po' rientra (verso la terminazione dei capillari per il calo della pressione idrostatica), il resto trasporta gli antigeni nel sistema linfatico (10-15 ml). Le cellule di Langherans formano una rete che intercetta il patogeno e lo fagocita, contemporaneamente sciolgono la membrana basale, la attraversano e tramite i vasi raggiungono i linfonodi, dove presentano gli antigeni.

LINFOCITI

MATURAZIONE DEI LINFOCITI

[Lo sviluppo dei linfociti o maturazione linfocitaria è il processo in cui precursori privi di recettori si trasformano in linfociti maturi. Inizia grazie a recettori di membrana che inducono proliferazione e riarrangiamento dei geni per i recettori. La maturazione avviene **negli organi linfoidi primari** e prevede una serie di fasi. 1- **Differenziamento** dei precursori verso linea B o T. 2- **Proliferazione**. 3- **Riarrangiamento dei geni recettoriali**. 4- **Selezione** positiva delle cellule con recettore funzionante ed eliminazione di cloni autoreattivi. 5- Differenziamento dei linf in **sottopopolazioni** distinte per fenotipo e funzioni. Una serie di meccanismi epigenetici sono coinvolti nella maturazione: modificazioni istoniche sono necessarie al reclutamento delle proteine responsabili del processo di ricombinazione. I miRNA hanno un ruolo nella maturazione e possono essere protettivi dall'apoptosi.

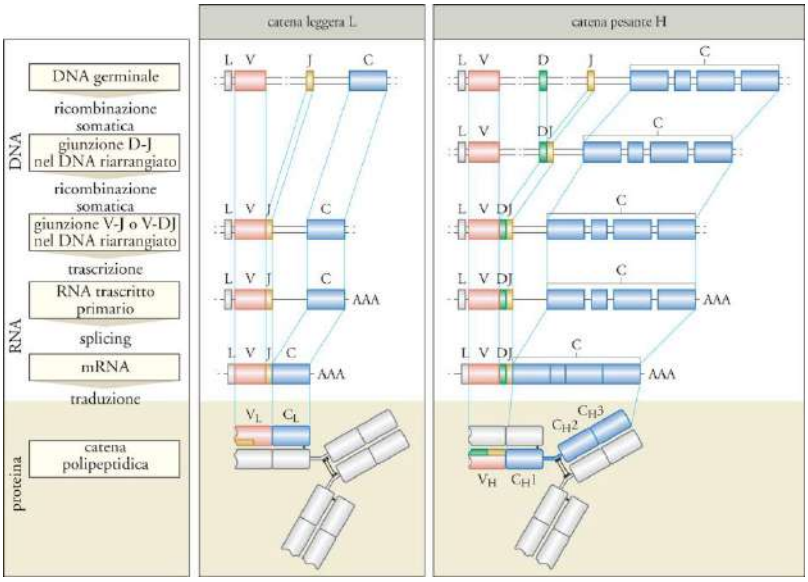
Cellula ematopoietica pluripotente HSC → precursore B T NK → linea B e linea T NK. Linea B: linf pro B → linf B follicolare, linf B1, linf MZB (marginal zone). Linea T NK → linf NK e linf pro T → linf T αβ e linf T γδ. **CD sono cluster of differentiation**, molecole esposte sulla superficie cellulare. Il numero di linfociti è circa 10^11. Proliferazione omeostatica: il numero di linf naive raggiunge un valore e si mantiene costante.]

ORIENTAMENTO DEI PRECURSORI VERSO LINEA B O T E PROLIFERAZIONE. Tutti i linfociti derivano dai **progenitori linfoidi** originati dalle HSC hematopoietic stem cells **presenti in fegato e midollo osseo**. L'attivazione di alcuni recettori di membrana induce l'espressione di fattori che "smascherano" i geni per i recettori B oppure T. Questi geni vengono riarrangiati ed espressi, e insieme ad essi molti altri geni del differenziamento. I fattori di trascrizione specifici per linf T sono Notch-1 e GATA-3, mentre per linf B sono EBF, E2A e Pax-5. La **proliferazione** è dovuta prima alle citochine, poi a segnali generati da un pre-recettore in caso di corretto riarrangiamento dei geni recettoriali. Il secondo tipo di segnale è molto più importante.

PRODUZIONE DELLA DIVERSITA' RECETTORIALE (BCR E TCR)

CELLULA	RECETTORE	ATTIVITA'
Cellula staminale indifferenziata	Nessuno	
Linf pro B/T	Nessuno	Espressione di RAG
Linf pre B/T	Catena pesante / β + catena alternativa	Proliferazione
Linf immaturo	Recettore di membrana completo	Selezione e uscita dagli organi linfoidi primari
Linf maturo vergine (naive)	Recettore di membrana completo	Ingresso nei linfonodi alla ricerca dell'antigene
Linf attivato (effettore)	Recettore di membrana completo	Proliferazione e produzione di anticorpi solubili/citochine

Lungo i cromosomi ci sono diversi segmenti per ogni dominio (variabile e costante). Il **dominio variabile** è codificato da un esone costituito da **segmenti V variability, D diversity e J joining**. Organizzazione dei geni delle Ig. Locus della catena H heavy: 45 V – 23 D – 6 J – 9 C (per i diversi isotipi e sottogruppi); locus della catena leggera k (preferenziale): 35 V – 5 J – 1 C; locus della catena leggera λ (scelta secondaria): 30 V – 4 JC. Ogni segmento misura circa 300 bp e sono organizzati in cluster al 5' di ogni locus, per un totale di circa 2000 kb. A monte di ciascun V sono presenti l'esone leader (per il peptide di trasporto) e il promotore. I segmenti costanti possiedo 5-6 esoni nel locus heavy, 1 solo esone nei loci delle catene leggere. Al 3', associati ai segmenti costanti, ci sono i segmenti J joining, di circa 30-50 bp ciascuno. I tre loci sono segregati su cromosomi diversi. Organizzazione dei geni del TCR. Il locus β possiede 50 V – (1 D – 6 J – 1C)x2, mentre il locus α possiede 45 V - 55 J – 1C. L'organizzazione è identica al locus delle Ig. I loci per γ e δ sono un po' atipici. **L'ansa CDR3 comprende zone di V, D e J, inoltre alle saldature tra i segmenti si verificano le mutazioni puntiformi, quindi la variabilità è massima**. CDR1 e 2 sono interne al segmento V. Le regioni non codificanti svolgono un ruolo fondamentale nella ricombinazione. (14-2-22-7-14)



Servono **uno o due eventi di ricombinazione** (V – J → VJ per catena leggera e catena α; V – D – J → V – DJ → VDJ per catena pesante e catena β). Durante la ricombinazione specifiche regioni della cromatina vengono "scoperte", i segmenti scelti vengono avvicinati, si eseguono tagli a doppia elica e inserimento di nucleotidi alle estremità, quindi le terminazioni vengono ricongiunte. L'esone della regione variabile entra nel trascritto primario insieme all'esone della regione costante. Le proteine della ricombinazione sono guidate da **RSS sequenze segnale della ricombinazione**, costituita da eptamero vicino al segmento codificante (7 nucleotidi conservati), spaziatore (12 o 23 nucleotidi non conservati, cioè uno o due giri di elica) e nonamero lontano dal segmento codificante (9 nucleotidi conservati). Durante la ricombinazione si ha un **appaiamento di due RSS** (rivolte in senso opposto) di due segmenti, vengono effettuati tagli a doppia elica tra gli eptameri e i segmenti codificanti, che vengono uniti, mentre l'anello di DNA tagliato viene deleto. In certi casi, nella catena k delle Ig, le RSS sono rivolti nella stessa direzione, quindi dal loro appaiamento deriva un'inversione delle sequenze intermedie. **Regola 12/23**: l'appaiamento di RSS può avvenire solo se uno spaziatore è 12 e l'altro 23, per garantire il corretto assortimento (i segmenti D hanno spaziatori di 12 su entrambi i lati). Le RSS sono presenti solo sui geni Ig e TCR, mai su altri. La ricombinazione avvicina i promotori alle sequenze **enhancer**, che stimolano la trascrizione.

Meccanismo molecolare di ricombinazione. 1- **Sinapsi**: i due segmenti genici scelti vengono messi in contatto tramite le RSS. 2- **Taglio**: i prodotti dei geni RAG 1 e 2 (recombination activating gene, espressi solo nei linfociti) formano il complesso ricombinasi, che taglia il doppio filamento fra eptamero e CDS generando e tenendo in posizione un'hairpin (in quanto l'OH al 3' di un filamento si lega al 5' dell'altro) e un doppio filamento troncato (estremità dell'RSS), che fronteggiano i corrispettivi dell'altro segmento. 3- Le hairpin vengo aperte e rimaneggiate **dell'endonucleasi Artemis**, che lascia estremità asimmetriche che vengono riempite dai nucleotidi P complementari allo stampo. Successivamente la **Terminal deoxynucleotidyl transferase TdT** aggiunge fino a 20 nucleotidi N casuali alle estremità, per aumentare la variabilità. TdT è

espresso allo stato di pro-linfocita, ma non di pre-linfocita, quindi ha effetto massimo sulla catena pesante e non sulla catena leggera. 4- Unione: si attiva l'**unione delle estremità non omologhe**, un sistema di riparazione delle rotture a doppia elica (Ku70 e Ku80 ricongiungono le estremità e reclutano l'enzima DNA-PK in grado di riparare la doppia elica). Le estremità RSS vengono anch'esse unite e forniscono un segnale di avvenuta ricombinazione. Verranno espressi solo i geni che generano letture in frame.

La **diversificazione** dei recettori è data dalla **diversità combinatoriale** e dalla **diversità giunzionale**. La prima è il prodotto del numero dei segmenti genici di ogni locus (un numero nell'ordine delle migliaia al massimo), mentre la seconda è il risultato dei nucleotidi rimossi e aggiunti in maniera casuale (P ed N). A causa della diversità giunzionale il grado di variabilità è massimo in corrispondenza delle giunzioni tra V e C, cioè proprio dove si forma la CDR3. La diversità potenziale è 10^11 per le Ig, 10^16 per i TCRαβ, 10^18 per i TCRγδ. Considerando i processi falliti e i recettori eliminati dalla selezione, la diversità recettoriale conta un numero di 10^7 recettori diversi.

MATURAZIONE DEI LINFOCITI B Nel midollo il linf pro-B inizia l'espressione dei RAG e di TdT, svolge la ricombinazione VDJ e produce una catena pesante; quindi diminuisce l'espressione di RAG e TdT, e il peptide viene verificato: si associa la catena pesante prodotta ad una leggera surrogata invariante e forma un complesso surrogato (catena pesante definitiva + catena leggera invariante) che è inserito nella membrana associato alle proteine Igα e Igβ che trasducono il segnale formando il recettore pre-B. In questo modo si verifica (checkpoint) se la catena prodotta funziona e si può andare avanti con la ricombinazione oppure se è il caso di usare il secondo locus della catena pesante. Se anche il secondo tentativo fallisce, la cellule muore per mancanza di segnali di sopravvivenza (esclusione allelica). I linf ora detti pre-B iniziano il riarrangiamento dei loci per la catena leggera κ: se si ha il riarrangiamento produttivo della catena κ questa viene prodotta e si potrà formare il recettore funzionale, se non si ha un riarrangiamento produttivo si prova l'altro locus per κ, se non va bene si passa al locus di λ e se anche qui entrambi i due loci non funzionano la cellula va in apoptosi. Si raggiunge quindi il linfocita immaturo che ha un recettore completo ed è in grado di esprimere IgM. A questo punto i geni RAG non servono più per cui sono inibiti. I linfociti B che riconoscono antigeni autoreattivi sono indotti a modificare la loro specificità attraverso l'editing recettoriale: sono riattivati i geni RAG, avviene nuovamente il riarrangiamento e la produzione di una nuova catena leggera per esprimere un recettore diverso non autoreattivo. Si possono fare vari tentativi (uno per ogni locus, in totale 4: 2 κ e 2 λ) e nel caso non si ha successo si ha l'apoptosi (selezione negativa). La selezione positiva dipende dalla presenza del recettore di membrana che trasduce il segnale di sopravvivenza. Il linf B è ora maturo.

PROCESSI DI SELEZIONE. Una serie di checkpoint garantisce che solo le cellule che si stanno differenziando correttamente proseguano nella maturazione. 1- **Corretta espressione del pre-recettore**, cioè di una delle due catene recettoriali, la catena pesante per il BCR e la catena beta per il TCR. La catena trasduce un segnale di sopravvivenza (solo 1/3 dei linf prosegue). Il riarrangiamento non è un processo successo/fallimento: per la catena pesante ci sono 2 alleli, per la catena leggera ci sono 2 alleli per k e 2 per λ. Quando una catena viene espressa il processo continua e vengono inibiti ulteriori riarrangiamenti della stessa catena. 2- **Corretta espressione del recettore**, cioè di entrambe le catene. 3- **Selezione positiva**: sono preservati i linf T che riconoscono correttamente gli MHC I o II. Per i linf B non c'è una selezione positiva analoga. 4- **selezione negativa**: meccanismo per il mantenimento della tolleranza al self, detto tolleranza centrale perché avviene negli organi linfoidi primari, subito dopo all'espressione del recettore. I linf T che riconoscono il self presentato dal timo sono eliminati per delezione clonale. I linf B autoreattivi sono indotti a riarrangiare i geni delle Ig, processo detto editing recettoriale (riattivazione dei geni RAG e revisione della giunzione VJ della catena leggera), se non ha successo il clone subisce delezione clonale.

LINFOCITI T

Linfociti T (timo): riconoscono l'antigene solo se presentato da MHC I e II. I recettori riconoscono solo codici peptidici di 8 – 20 aa.

- **Linf T CD4+ helper**: recettore eterodimero αβ, riconosce MHC II, CD3+ CD4+ CD8-. Opera differenziazione di linf B, attivazione di macrofagi, infiammazione. Producono segnali di membrana e solubili (citochine) che regolano la risposta. CD40 ligando è un segnale di membrana che si lega al recettore CD40 su tutte le cellule che vengono attivate dal linf T (macrofagi, linf B, cellule dendritiche). Il linf T helper diventa proinfiammatorio o antiinfiammatorio sulla base delle citochine che rileva ("imprinting"). Generalmente sono il doppio dei linf T citotossici.
- **Linf T regolatori**: recettore eterodimero αβ, CD3+ CD4+, CD25+. Sono il 10% dei CD4+. Svolgono ruolo inibitore della risposta immunitaria agendo su altri linf T (ad esempio proteggono un antigene self da un clone linfocitario autoreattivo che non si è suicidato). Operano la regolazione delle risposte immuni e il mantenimento della tolleranza verso il self.
- **Linf T CD8+ citotossico**: recettore eterodimero αβ, riconosce MHC I, CD3+ CD4- CD8+. Crea una giunzione con la cellula che ha presentato l'antigene non self (infetta o trapiantata) e la distrugge. I linfociti T CD8+ citotossici hanno abbondante citoplasma contenente granuli rossi ricchi di perforina (buca la membrana) e granzimi (attivano la via delle caspasi). Per mandare in apoptosi il target il linf può esporre i FAS-ligandi (ligandi di morte) sulla sua superficie oppure liberare i propri granuli.
- **Linf T γδ**: derivano dalle HSC del fegato fetale. Sono i linfociti in cui il riarrangiamento delle catene γ e δ è terminato prima delle β. Sono meno del 5% di tutti i linf. In maniera casuale vengono generati sempre gli stessi pochi recettori (solo pochi segmenti V,D e J sono usati, nonostante ce ne siano molti) che riconoscono strutture altamente condivise dai patogeni. La diversificazione della regione variabile del recettore cambia in base al tessuto in cui risiedono. Il TCR si associa comunque a CD3 e ζ, in maniera identica ai linf T αβ. Non esprimono CD4 né CD8, quindi non sono ristretti per MHC. Riconoscono molti tipi di antigeni (proteine e lipidi, molecole fosforilate e alchilamine), alcuni presentati da MHC I non convenzionali (come CD1, che ha 4 geni), altri da soli. Possono essere attivate da heat shock proteins. Hanno funzioni helper e citotossiche ed esercitano **difesa precoce a livello delle barriere epiteliali**, dove abbondano. Operano anche monitoraggio ed eliminazione delle cellule sottoposte a danno, oltre alla produzione di citochine.
- **Linf NKT**: possiedono le stesse molecole di membrana delle cellule NK (CD16) e dei linf T (recettore αβ), hanno funzioni helper e citotossiche. I linf NKT con limitata variabilità del recettore sono detti invarianti. Riconoscono **lipidi e glicolipidi presentati da MHC non classiche, dette CD1** (simili a MHC I). Le CD1 riciclano tra la membrana cellulare e apparati vescicolari, esponendo i lipidi endocitati. I linf NKT possono produrre rapidamente citochine come IL-4 e IFN, quindi hanno un ruolo nella protezione precoce da patogeni. Hanno effetto regolatorio sia sull'immunità innata che su quella adattativa. Possiedono recettori per l'Fc delle IgG.

MATURAZIONE. Il linfoblasto (CD4- CD8- TCR-) migra nel timo e va incontro a differenziazione: nella corticale può diventare linf T γδ (TCR γδ +) oppure linf pre T (doppio negativo → doppio positivo), nella midollare si differenzia in T helper o T citotossico, quindi migra in periferia.

Linf pre T	Doppio positivo	Linf T helper	Linf T citotossico
CD3+ CD4- CD8-	CD3+ CD4+ CD8+	CD3+ CD4+ CD8-	CD3+ CD4- CD8+

I precursori dei linf di fegato fetale e midollo osseo migrano fino al timo, dove si collocano nella corticale esterna. Il microambiente è ricco di chemochine che guidano la migrazione e IL-7 che stimola la crescita. Le cellule in corso di maturazione sono dette **timociti e migrano dalla corticale alla midollare** (guidati dal recettore CCR7). All'arrivo nella corticale esterna sono privi di tutte le catene, sono **linf pro-T doppio-negativo** (possiedono solo CD44 per l'adesione e CD25 per l'IL2). Meno del 10% darà origine a linf T γδ. Inizia l'espressione di RAG, che permette l'espressione della catena β del TCR e quindi la transizione a **linf pre-T**. Circa la metà dei linf ha successo e riesce a esprimere la catena in associazione ad una proteina invariante (pre-Tα) e ai corecettori (nel caso può provare anche l'altro allele), formando il recettore pre-T. Il **recettore**

pre-T invia segnali di sopravvivenza, induce la proliferazione, stimola il riarrangiamento delle catene α mentre inibisce ulteriore riarrangiamento β e induce la transizione allo stato **doppio positivo**. Si produce il **TCR completo** (con CD3 e ζ). Il riarrangiamento delle catene α può avvenire su entrambi gli alleli, generando due TCR distinti, oppure su uno solo. Se nessuno dei due alleli ha successo il linf va in apoptosi. Il linf doppio positivo viene selezionato dai complessi MHC-peptide, subendo delezione clonale in caso di non riconoscimento del complesso o di eccessiva avidità di legame. Se i linfociti riconoscono l'MHC di classe I impegneranno il CD8 e quindi verrà soppressa l'espressione di CD4, e viceversa se riconosceranno MHC di classe II impegneranno CD4 e l'espressione di CD8 sarà soppressa, diventando linf T singolo positivi. Questo è un fenomeno di selezione positiva. Le cellule epiteliali della midollare del timo esprimono una proteina nucleare detta AIRE che promuove l'espressione a bassi livelli di alcuni antigeni che normalmente sono espressi solo in particolari organi periferici.

spesso si trova in linfociti αβ una ricombinazione inefficace dei geni γδ, un linfocita può provare a diventare γδ ma se non gli funziona la ricombinazione prova a diventare αβ.

SELEZIONE. Durante la migrazione da corticale a midollare il **repertorio linfocitario immaturo** (capace di riconoscere self/non self presentato da MHC self/non self) viene selezionato dai complessi MHC-antigene self generati dalle cellule epiteliali timiche. **I TCR che si legano a complessi MHC-antigene self a bassa affinità subiscono selezione positiva**, perché sono quelli che riconoscono MHC self. Quelli incapaci di legarsi vanno incontro a morte per deprivazione (mancanza di segnali di sopravvivenza). Contestualmente, in base all'MHC riconosciuto, si differenziano in CD4+ (MHC II) e CD8+ (MHC I), secondo la teoria educativa (contrapposta al modello stocastico, interamente probabilistico). Il segnale forte dell'MHC II o I induce l'attivazione di fattori di trascrizione specifici che guidano il differenziamento CD4 o CD8. Alcuni peptidi presentati dall'MHC sono più efficaci di altri a favorire la selezione positiva. Il debole legame TCR-complesso favorisce la sopravvivenza di cloni che, una volta maturi, potrebbero riconoscere casualmente antigeni non self in maniera abbastanza forte da scatenare una risposta immune. **I TCR che si legano a complessi MHC-antigene self ad alta affinità subiscono selezione negativa**, cioè muoiono per apoptosi, perché sono quelli **autoreattivi** (tolleranza centrale al self). La selezione negativa può avvenire sia allo stato di doppio positivo che di singolo positivo. La selezione negativa è permessa dalla proteina nucleare **AIRE autoimmune regulator**, che fa esprimere molti geni tessuto specifici. In certi casi invece che andare in apoptosi il linf selezionato negativamente si differenzia in **linf T regolatore CD4+**, una sottopopolazione che previene le reazioni autoimmuni. Forse questo evento è causato da un legame non fortissimo al complesso MHC-antigene. La selezione negativa non interessa i linf T γδ, che non esprimono CD4 né CD8. Il 95% dei linf muore prima di raggiungere la midollare. Una volta differenziati lasciano la midollare ed entrano in circolo (guidati dal recettore per la S1P). Da qui in poi il riconoscimento ad alta affinità del complesso MHC-antigene non causa la morte per apoptosi, ma stimola la risposta immunitaria.

RICIRCOLAZIONE LINFOCITARIA. **i linf vergini escono dal timo e ricircolano tra sangue, linfa e aree T dei linfonodi**. Il sistema è estremamente efficiente e il tempo di permanenza di un linf in un linfonodo aumenta se questo drena un tessuto infiammato. **Ingresso dei linf T nei linfonodi**: l'interazione tra L-selectina dei linf T e il PNAd (addressina dei linfonodi periferici) delle HEV permette il rolling, a cui segue il legame dell'integrina LFA-1 con ICAM-1, grazie alle chemochine CCL19 e 21 recepite dal recettore CCR7. Se non incontrano il proprio antigene i linf si staccano e rientrano in circolo. **Il tempo di permanenza del linf T nel linfonodo dipende dalla sfingosina-1-fosfato S1P e dal suo recettore**: nel sangue e nella linfa la concentrazione di S1P è alta, condizione che causa l'internalizzazione dei recettori. Nei tessuti (e quindi nel parenchima del linfonodo) la concentrazione di S1P è bassa a causa dell'S1P-liasi, condizione che induce il linf ad aumentare l'espressione di recettori, che lo guidano di nuovo verso il circolo entro poche ore (linf naive) o giorni (linf attivati). **In seguito all'attivazione** l'IFN-1 inibisce la riespressione del recettore per giorni, quindi il linf T resta nel linfonodo per il tempo necessario alla proliferazione. S1P è coinvolto anche nell'uscita dei linf T dal timo e dei linf B attivati dagli organi linfoidi secondari. La migrazione dei linf T negli altri organi

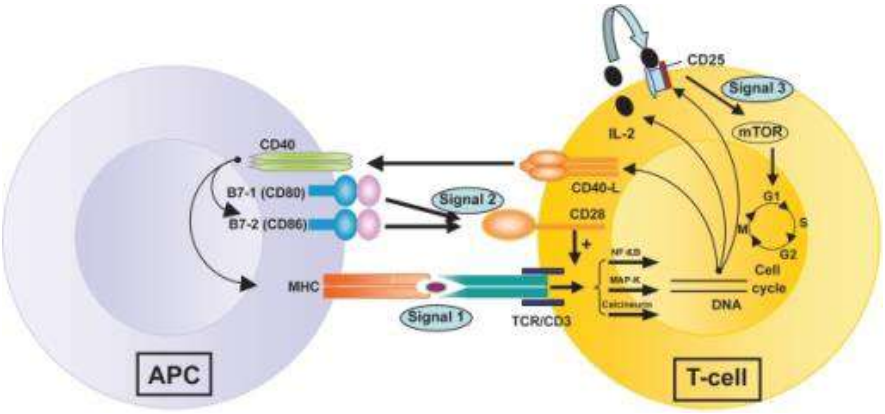
linfoidi secondari è simile, ma nella milza sembra essere meno finemente regolata. In seguito all'incontro con l'antigene l'espressione di integrine aumenta, permettendo la ritenzione nel linfonodo per il tempo necessario alla proliferazione e al differenziamento. Dopo 24-48 ore l'affinità di queste integrine cala, così i linf effettori possono raggiungere i tessuti periferici. L'uscita dei linf attivati dai linfonodi avviene principalmente attraverso i vasi linfatici. Una volta attivati i linf T effettori riducono l'espressione di L-selectina, mentre aumentano quella degli elementi necessari al reclutamento nelle venule post-capillari dei tessuti infiammati (ligandi per le E e P-selectine espresse dall'endotelio attivato). Integrine LFA-1 e VLA-4 rendono saldo il legame all'endotelio attivato. Difficilmente i linf T effettori possono lasciare il tessuto infiammato. Diverse popolazioni hanno diverse proprietà migratorie e alcune migrano in tessuti preferenziali (cute, intestino…) in seguito a determinati stimoli delle cell dendritiche. I linf T della memoria centrale si localizzano negli organi linfoidi secondari, mentre quelli della memoria effettrice nei tessuti periferici.

RIASSUNTO

- **Da midollo a timo**: CD44, CD25 (recettore di IL-2), CCR7
- **Da timo a linfonodi**: L-selectina con PNad, LFA-1 con ICAM-1, CCR7 con CCL19 e 21.
- **Ricircolazione**: S1P e suo recettore
- **Attivazione**: espressione di S1PR cala (INF1, CD69), di integrina aumenta, ma dopo 24-28 ore inverso, CTLA-4, CD25 e IL-2, no L-selectina, sì ligandi per E, P-selectina
- **Legame ad endotelio**: ligandi per E e P selectine, integrine

ATTIVAZIONE. [L'attivazione dei linf a livello degli organi linfoidi secondari genera una popolazione di cellule effettrici e una di cellule memoria tutte rivolte verso lo stesso antigene. I linf T si muovono fino a quando incontrano un antigene, quindi si arrestano per stabilizzare l'interazione linf T – APC. **Il legame induce secrezione di citochine, proliferazione e differenziamento**. Le risposte sono direzionate e modulate in primo luogo dalle APC. In seguito all'attivazione i linf T acquisiscono funzione effettrice, quindi migrano nei tessuti, dove incontrano nuovamente l'antigene. Vengono generati anche i linf T della memoria, cellule a lunga vita che rispondono rapidamente ad un successivo incontro dell'antigene. In seguito all'eliminazione dell'antigene cessano i segnali di sopravvivenza dei linf T effettori e l'infiammazione, quindi si ripristina l'omeostasi.]

L'attivazione dei linf richiede il riconoscimento dell'antigene esposto da cellule dendritiche, che sono state opportunamente attivate dall'immunità innata. Queste espongono sulla superficie le giuste molecole costimolatrici. **DC e linf T, guidati dal recettore CCR7, si incontrano nell'area T dei linfonodi**. Possono fungere da APC per i linf T anche i linf B e i macrofagi. In assenza di costimolatori il linf T va in apoptosi o entra in uno stato di non responsività (anergia). La **costimolazione** meglio conosciuta è quella operata dal recettore linfocitario **CD28** (omodimero con un dominio Ig per catena) e i suoi ligandi **B7-1 e B7-2** (glicoproteine integrali di membrana con 2 domini Ig). B7-2 è prodotta precocemente, B7-1 tardivamente. B7 sono prodotte dalle APC attivate, in seguito a stimolazione dei Toll-like receptors o per azione dell'IFN. I linf T CD4+ attivati inducono la produzione di B7 tramite la via di amplificazione del CD40. **Processo di licensing**: il linf T esprime CD40 ligando (proteina transmembrana della famiglia del TNF), che si lega al CD40 receptor sull'APC, stimolando la produzione di B7 e di citochina IL-12 per il differenziamento dei linfociti. Livelli bassi e costitutivi di B7-2 e la presentazione di antigeni self garantiscono la sopravvivenza dei linf T



regolatori. La via del CD28 rafforza e affianca la via di trasduzione del TCR. Gli effetti finali sono: produzione di proteine anti-apoptotiche e citochine (tra cui IL-2), aumentata attività metabolica, proliferazione e differenziamento in effettori e memoria. Questi ultimi sono poco o nulla dipendenti dalla via del CD28. Sono stati trovati vari analoghi di B7, alcuni attivatori, altri inibitori. Un altro recettore linfocitario costimolatorio ben caratterizzato è ICOS inducible costimulator (per i T helper follicolari). Ci sono anche recettori inibitori di B7, detti CTLA-4 e PD-1. CTLA-4 ha alta affinità per B7, quindi in presenza di bassi livelli di costimolatore CTLA-4 si attiva, sopprimendo la risposta immune. Talvolta le vie costimolatorie sono sovrapponibili, talvolta hanno funzioni differenti. Altre vie costimolatorie dipendono da proteine della famiglia CD2, integrine e recettori del TNF. Sono in studio terapie che coinvolgono inibitori dei recettori (CD28, CD40, CTLA-4, PD-1).

LINCENSING: linf attivati esprimono CD40L che fa esprimere IL-12 e B7 + CD2, integrine e recettori del TNF + ICOS + CTLA-4 e PD-1

La **modificazione dell'espressione di molecole di membrana**, ben caratterizzata per i linf T CD4+ helper, è associata all'ottimizzazione delle funzioni. Avviene tra 2-5 ore e 1-2 giorni dopo l'attivazione del linf ed è seguita dal picco nella divisione cellulare. CD69: riduce l'espressione del recettore per la S1P, permettendo la ritenzione dei linf T nei linfonodi, garantendo la stimolazione sufficiente per la proliferazione. Dopodiché la produzione cessa, permettendo la fuoriuscita dei linf attivati dai linfonodi. CD25: recettore per l'IL-2, prodotta dai linf stessi, stimolandone la proliferazione. Solo i linf attivati producono sia IL-2 che il suo recettore, garantendo la selettività. CD40 ligando: necessario per il licensing (feedback positivo) e l'attivazione di linf B e macrofagi. CTLA-4: recettore inibitore per la modulazione della risposta, espresso 1-2 giorni dopo l'attivazione. Riduzione delle molecole per l'ingresso negli organi linfoidi (L-selectina) e aumento di quelle per la migrazione nei siti periferici (integrine, E e P-selectina, recettori per le chemochine,…) fra cui CD44, che lega l'acido ialuronico.

Espansione clonale: aumento del numero di cellule che appartengono al clone specifico per l'antigene. Il linf T attivato si trasforma in linfoblasto, cioè linfocita di grandi dimensioni, quindi va incontro a proliferazione. La frequenza di linf specifici per l'antigene passa da 1 / 10^5 – 10^6 a 1/3 per i linf CD8+ citotossici (**aumento di oltre 50000 volte**) e a 1/100 per i linf CD4+ helper, entro una settimana dall'infezione. Il numero di cellule crolla non appena l'infezione è debellata, perché scomparendo l'antigene vengono a mancare i segnali di sopravvivenza dei linfociti effettori.

FASE EFFETRICE: RISPOSTA T CD4+ HELPER

I linfociti T effettori esprimono molecole di membrana e citochine solubili che mediano: attivazione dei fagociti, dei linfociti T e B, infiammazione, produzione di linf T memoria e citolisi mediata da linf T citotossici. Il meccanismo effettore principale è l'immunità cellulo-mediata, cioè l'attivazione dei fagociti per l'eliminazione di microbi intracellulari e quelli fagocitati. I linf T aumentano e dirigono la funzione fagocitica, soprattutto nei casi in cui il patogeno si è evoluto per aggirare l'immunità innata. L'attivazione è dovuta alle citochine e al CD40 ligando. Spesso alla risposta si associa l'infiammazione, che può anche danneggiare un tessuto normale (ipersensibilità di tipo ritardato). Esistono sottopopolazioni di linf T effettori che si distinguono in base alle citochine e ai fattori di trascrizione prodotti, a causa delle variazioni epigenetiche a livello dei geni delle citochine. La suddivisione è soggetta a limitazioni: ci sono linf con profilo citochinico eterogeneo o limitato, o che cambia in seguito a un evento, inoltre questi linf non sono gli unici responsabili della secrezione di citochine durante la risposta. Il differenziamento è anche influenzato dal profilo genetico dell'individuo.

I linf effettori mutano le proprie molecole di adesione e i propri recettori per le chemochine, quindi migrano verso il sito di infezione. Quando incontrano l'antigene per cui sono specifici subiscono variazione dell'affinità delle integrine VLA-4 e 5 (per la fibronectina della matrice extracellulare) e della molecola CD44 (legame all'acido ialuronico). In questo modo **i linf effettori sono selettivamente trattenuti nei siti extravascolari**. **I**

linf T helper follicolari invece rimangono nei linfonodi e svolgono azione di supporto verso i linf B. Le diverse sottopopolazioni di linf T CD4+ esprimono diversi recettori per le chemochine e diverse molecole di adesione, quindi vengono guidati verso siti di infiammazione diversi (in base al tipo di patogeno).

Le risposte non sono mai pure, ciascuna di esse attinge in minima parte agli effettori delle altre. Si attivano tante cellule dendritiche e ognuna cerca di imprimere la propria risposta, in base al danno che ha rilevato. La risposta va incontro a **polarizzazione**: 1- **Induzione**: si attiva la trascrizione delle citochine specifiche. 2- **Indirizzamento**: se la stimolazione continua si hanno modificazioni epigenetiche nei geni delle citochine (alcuni sempre ON, altri sempre OFF). 3- **Amplificazione**: le citochine prodotte favoriscono lo sviluppo di quella sottopopolazione, mentre inibiscono le altre. Questo vale sia per la prima risposta sia per le risposte successive. I linf rilevano dei segnali prodotti dall'immunità innata a livello dell'organo linfoide, specialmente ma non solo dalle cellule dendritiche (es. IFNγ, IL-4…) e cominciano a produrre gli stessi, autoalimentandosi. Ogni sottopopolazione è indotta dal tipo di patogeno per cui è specifica.

Segnali	IL-12, IFNγ	IL-4	IL-6, IL-1, TGFβ, IL-23
Risposta T	T_H1	T_H2	T_H17
Citochine	IFNγ	IL-4, IL-5, IL-13	IL-17 A, IL-17 F, IL-22
Risposta	Attivazione dei macrofagi; Switch IgM → IgG	Attivazione di mastociti ed eosinofili; Switch IgM → IgE; Attivazione alternativa dei macrofagi	Attivazione di neutrofili e monociti
Difesa da	Microbi intracellulari	Parassiti elmintici	Batteri extracellulari e funghi
Patogenesi	Malattie autoimmuni, danno da infezioni croniche	Malattie allergiche	Autoimmunità organospecifica

La **risposta T_H1** è stimolata da **batteri e parassiti** che infettano DC e macrofagi. Le cellule NK producono INF, che stimola le APC a produrre **IL-12**. I fattori trascrizionali specifici sono STAT1, STAT4 e T-bet. Molecole prodotte: INF, CD40 ligando, TNF, chemochine, IL10 (molecola inibitoria). L'effetto sinergico di IFN e CD40L induce nel fagocita la produzione di enzimi lisosomiali, ROS e NO. I macrofagi attivati stimolano l'**infiammazione** e amplificano la **risposta immunitaria cellulo-mediata**. La risposta T_H1 può causare danno tissutale lieve (prodotti microbicidi attaccano il tessuto) o, in certi casi, ipersensibilità di tipo ritardato. L'attivazione classica dei macrofagi inibisce quella alternativa e viceversa. L'INFgamma stimola l'espressione di diverse proteine (soprattutto MHC, proteasoma, B7) che contribuiscono a una migliore presentazione dell'antigene e all'attivazione dei linfociti T; agendo sui linfociti B, promuove lo scambio isotipico verso alcune classi di IgG, induce polarizzazione dei linf T_H1.

La **risposta T_H2**, detta difesa fagocito-indipendente. La risposta T_H2 si verifica **in assenza di infiammazione**, quando non c'è risposta innata né attivazione macrofagica, ma i linf subiscono stimolazione cronica da parte di **IL4**, prodotta inizialmente da mastociti e da cellule linfoidi innate, poi dai linf T CD4+ stessi in quantità sempre maggiori. IL-4 induce STAT6, fattore trascrizionale di GATA-3, che attiva l'espressione del pannello di citochine specifiche e guida la polarizzazione. Tra le altre citochine fondamentali per lo sviluppo ci sono IL-25, IL-33, TSLP (Thymical Stromal LymphoPoietin). IL4 (di T_{HF}) induce lo **switch verso IgE**, IL5 attiva gli eosinofili, IL13 agisce di concerto con IL4 per varie risposte (attivazione alternativa dei macrofagi, difesa delle barriere e reclutamento di leucociti). Le IgE prodotte opsonizzano il patogeno, che viene riconosciuto dagli **eosinofili, che liberano i propri granuli** (proteina basica maggiore e proteina cationica maggiore). **Le IgE di membrana dei mastociti** legano il patogeno e **tramite degranulazione inducono l'infiammazione locale**. Aumenta la produzione di muco e la peristalsi intestinale, difese della barriera immunitaria. **L'attivazione alternativa dei macrofagi** causa la proliferazione di fibroblasti e la sintesi di collageno, insieme

all'angiogenesi, e ha effetti antinfiammatori. **La fibrosi blocca il parassita in una cicatrice, uccidendolo o rallentandolo**. Questa risposta è contro elminti e allergeni.

Risposta T_H17. Il pattern di citochine pro T_H17 è prodotto dalle DC quando rilevano glucani fungini o corpi apoptotici di cellule infettate da **batteri e funghi**. Il **TGFβ**, citochina antinfiammatoria, induce la risposta T_H17 in presenza di citochine proinfiammatorie (IL-6 e IL-1 nelle fasi iniziali per il differenziamento, IL-23 per proliferazione e mantenimento dei T_H17). L'ambiente tissutale (mucosa intestinale) forse è importante per la differenziazione T_H17. I fattori trascrizionali specifici sono STAT3 e ROR. La risposta T_H17 richiama i **neutrofili** nel tessuto, questi vivono solo poche ore, poi **muoiono rilasciando i propri granuli con gli enzimi**, che attaccano il patogeno e tutto il tessuto. Gli enzimi agiscono bene a pH acido, come è il tessuto infiammato. Il tessuto diventa un liquido viscoso, il **pus**, che viene drenato all'esterno. **IL17 e IL22** aumentano le difese di barriera e stimolano la produzione di peptidi antimicrobici (defensine). I linf T_H17 collaborano con i T_H1, reclutando i fagociti che questi poi attivano. La risposta T_H17 è coinvolta nella patogenesi di molte malattie infiammatorie. L'IL-17, prodotta abbondantemente dai linfociti T_H17, promuove un'infiammazione caratterizzata da una forte componente neutrofilica e stimola la produzione di sostanze antimicotiche. L'IL-22 è prodotta da queste cellule soprattutto nei tessuti epiteliali e ne mantiene l'integrità promuovendo le funzioni di barriera meccanica degli epiteli, stimolando la loro riparazione. L'IL-21 ha funzione nella risposta anticorpale, specialmente nei centri germinativi ed è anche coinvolta nella differenziazione die linfociti T_H17.

FASE EFFETRICE: RISPOSTA CD8+ CITOTOSSICA

I linf T citotossici (CTL) sono importanti per l'**uccisione di cellule infettate da virus** (cellule prive di capacità antimicrobica o virus citoplasmatici non attaccabili) **e di cellule tumorali**. Nel differenziamento da linf naive a CTL effettori le cellule acquisiscono la capacità di uccidere le cellule bersaglio tramite granuli contenenti **proteine lisosomiali (tra cui perforine e granzimi) e la secrezione di citochine (tra cui IFN di tipo I)**. Il fattore di trascrizione che ne regola l'espressione è T-bet. I linf citotossici sono attivati da antigeni presentati dall'MHC I delle cellule dendritiche. Se un virus infetta citotipi diversi dalle DC, allora si realizza la **presentazione crociata** (cross presentation): le DC ingeriscono la cellula bersaglio o le proteine da essa prodotte, una volta nel citosol gli antigeni proteici sono processati ed esposti sulle MHC I. Alcune sottopopolazioni di DC sono molto efficienti nella cross presentazione, altre meno. Nelle situazioni in cui c'è solo una debole stimolazione dell'immunità innata (infezioni virali latenti, trapianti d'organo e tumori) possono rendersi necessari i secondi segnali forniti dai linf T helper (citochine + licensing delle APC tramite CD40L). Le citochine fondamentali per la proliferazione e il differenziamento di linf citotossici effettori e della memoria sono IL2, IL12, IL15, IL21, IFN di tipo I. Per attenuare il danneggiamento del tessuto la risposta CD8+ può essere attivamente smorzata, un fenomeno detto **esaurimento funzionale**, che prevede un'alterazione nella produzione di IFN e l'espressione di recettori inibitori, come PD-1.

Quando il CTL incontra l'antigene per cui è specifico forma una **sinapsi con la cellula bersaglio**, quindi secerne le molecole letali nello spazio sinaptico, minimizzando la diffusione e quindi preservando le cellule sane adiacenti e sé stessa. Una volta attivato il CTL non ha bisogno di citochine e costimolatori, quindi può uccidere qualsiasi cellula nucleata che esponga l'antigene. E' sufficiente il legame al complesso MHC I-peptide e il legame integrina LFA-1 – molecola di adesione intercellulare ICAM-1. Queste molecole formano un anello che racchiude uno spazio distinto dall'esterno, costituito da dominio di trasduzione e dominio secretorio. Il CTL possiede anche KIR killer immunoglobulin receptor, che inviano segnali inibitori per evitare l'uccisione di cellule normali, e NKG2D, che riconoscono proteine simili a MHC I espresse da cellule danneggiate da uccidere.

La morte della cellula bersaglio avviene in 2-6 ore dopo il riconoscimento dell'antigene, anche se il CTL si stacca. Il CTL sferra un **colpo mortale**, inducendo la **morte per apoptosi**. In seguito all'attivazione il citoscheletro si riorganizza e i granuli migrano lungo i microtubuli verso la sinapsi, dove si fondono al dominio secretore e vengono esocitati. La **perforina**, omologa della proteina del complemento C9, altera la membrana

e permette l'ingresso di **granzim**i, serina-proteasi che tagliano le caspasi, attivandole. Il proteoglicano serglicina favorisce l'associazione tra perforina e granzimi. Probabilmente la perforina induce un processo di riparazione della membrana che causa l'internalizzazione dei granzimi in endosomi, da cui poi passano nel citosol. I granuli sono esocitati lontano dal CTL, inoltre la catepsina B degrada la perforina che si trova in prossimità della membrana del CTL, proteggendolo. I CTL possono anche operare la **via del Fas ligando**, che si lega ai recettori Fas sulle cellule bersaglio, attivando le caspasi e inducendo l'apoptosi. Le caspasi attivano anche alcune nucleasi che distruggono il DNA potenzialmente infettivo. I CTL collaborano con i linf T_H1 nell'attivazione dei macrofagi tramite la secrezione di IFN. I CTL sono coinvolti nella patogenesi di reazioni infiammatorie e cutanee di ipersensibilità da contatto.

I T helper coadiuvano i citotossici con la produzione di citochine. L'IL-2 promuove la proliferazione dei linfociti CD8+ e la loro differenziazione in CTL e cellule della memoria. L'IL-12 e IFN di tipo I stimolano la differenziazione dei linfociti T CD8+ naive in CTL effettori. L'IL-15 è fondamentale per la sopravvivenza dei linfociti CD8+ della memoria. L'IL-21 è fondamentale per l'attivazione dei linfociti CD8+ effettori e delle cellule memoria.

CELLULE MEMORIA

Vengono **prodotte subito**, insieme alle cellule effettrici, ma non agiscono con esse. In certi casi possono invece **derivare da linf T effettori sopravvissuti** in seguito all'infezione. Probabilmente il differenziamento tra effettori e memoria è dovuto a fattori di trascrizione specifici, forse scelti in maniera casuale o forse per effetto di segnali esogeni specifici. Aspettano di incontrare l'antigene, **senza bisogno di APC o di ulteriori citochine, per attivarsi** e dare luogo alla risposta. Le cellule memoria hanno morfologia e livelli di CD più simili ai linf vergine che ai linf effettori. Tutte possiedono CD27, di funzione sconosciuta. Alla nascita non ce ne sono, aumentano ad ogni risposta immunitaria. Persistono per molti anni, in certi casi per tutta la vita.

I **linf T della memoria centrale**, a livello degli organi linfoidi secondari (recettore CCR7 e L-selectina), possono dare origine a un grande numero di effettori. I **linf T della memoria effettrice**, nei tessuti periferici (specialmente le mucose), rilasciano citochine effettrici (IFN) oppure assumono profilo citotossico (senza proliferare). I linf T della memoria possono derivare da precursori più o meno differenziati, dando origine a effettori più o meno eterogenei, oppure differenziarsi solo dopo l'attivazione.

Le cellule della memoria hanno caratteristiche peculiari. L'alto livello di proteine anti-apoptotiche Bcl-2 e Bcl-X e un tasso basso ma continuo di proliferazione garantiscono una lunga sopravvivenza. La sopravvivenza dipende da alcune citochine (IL-7 e IL-15), ma non dal riconoscimento dell'antigene. Hanno alto livello di integrine e di CD44 (adesione) e bassi livelli di CD25 (attivazione). Il cambiamento nel grado di metilazione e acetilazione degli istoni di alcuni geni li rende più rapidamente responsivi alla stimolazione, quindi la risposta dei linf memoria avviene **in soli 1-3 giorni** (contro i 5-7 giorni dei linf T naive). L'aumentato numero di linf specifici per un antigene (10-100 volte rispetto ai linf T naive) garantisce una **risposta più robusta**. I linf memoria sono più elastici: possono migrare in tutti i tessuti e sono poco dipendenti dalla costimolazione.

LINFOCITI B

Linfociti B (bone): il recettore è autonomo, **riconosce l'antigene non processato** (le APC non sono necessarie, ma utili), si differenziano in **plasmacellule** (cellule secernenti anticorpi). Riconoscono **qualsiasi genere di antigene**. Prima della nascita vengono prodotti dal fegato, dopo la nascita dal midollo osseo. Le cellule staminali hanno CD43, i linf pro-B possiedono i marcatori di membrana CD19 e CD10.

- **Linf B follicolari**: possiedono recettori di membrana specifici per un antigene, recettori aspecifici per l'Fc degli anticorpi e MHC II. Si differenziano in plasmacellule (caratterizzate dal nucleo a ruota di carro e da abbondante reticolo di Golgi) che producono lo stesso recettore come anticorpo circolante (immunità umorale). Quando ne è stato prodotto tanto la superficie si satura dell'Ab stesso, quindi

la sua produzione cessa. Rispondono principalmente ad **antigeni proteici**, quindi sono gli **effettori della risposta T-dipendente** (attivazione classica). La localizzazione nel follicolo è permessa dal recettore CXCR5 per le chemochine.

- **Linf B1** (corrispondenti dei linf T γδ): Derivano dalle HSC presenti nel fegato fetale. La diversità recettoriale è bassa perché manca la TdT. Abbondano **nella cavità peritoneale e nelle mucose** (metà dei linf che secernono IgA). Esprimono il recettore scavenger CD5. Secernono spontaneamente solo **anticorpi naturali di tipo IgM** (non possono fare switch isotipico), rivolti **contro polisaccaridi e lipidi**. Sono detti naturali perché esistono nonostante non sia avvenuta un'immunizzazione (la fonte di antigeni forse è la flora batterica). Rispondono principalmente in maniera T-indipendente.
- **Linf BMZ (marginal zone)**: possiedono IgM con specificità limitate per un ristretto numero di **molecole polisaccaridiche**. Abbondano nella **milza**, in prossimità del seno marginale, e rispondono rapidamente ai microbi presenti nel sangue differenziandosi in plasmacellula a breve vita secernenti IgM, generalmente senza bisogno di attivazione T. Rispondono principalmente ad antigeni non proteici **multivalenti** in maniera T-indipendente. Derivano, come i linf B2 follicolari, dai linf B2 transizionali.

Linfocita	B follicolare	B zona marginale	B1
Ematopoiesi	Midollare	Alternativa	Alternativa (splenica)
Localizzazione	Milza e organi linfoidi	Milza e organi linfoidi	Tessuti mucosi, cavità peritoneale
Maturazione	Classica	Alternativa	Alternativa
Switch isotipico	Sì	No	No
Sopravvivenza	Variabile	Breve	Breve
Antigeni	Proteine	Glucidici	Glucidici e lipidici

MATURAZIONE DEI LINF B

CELLULA	RECETTORE	ATTIVITA'
Cellula staminale indifferenziata	Nessuno	Proliferazione
Linf pro B	Nessuno	Espressione di RAG e TdT
Linf pre B	Catena pesante μ + catena surrogata	Proliferazione
Linf B immaturo	IgM di membrana completa	Uscita dagli organi linfoidi primari
Linf B maturo vergine (naive)	IgM e IgD di membrana complete	Ingresso nella zona corticale dei linfonodi
Linf B attivato (effettore)	Altre catene pesanti (switch isotipico)	Maturazione classica
Plasmacellula	Ig solubili	Uscita dai linfonodi e produzione di anticorpi

MATURAZIONE. Il processo di maturazione richiede 2-3 giorni. Il **recettore pre-BCR** con catena M e catene leggere sostitutive si associa alle Igα e Igβ e trasduce un segnale proliferativo (probabilmente senza bisogno di ligando). Il pre-BCR invia un segnale che inibisce irreversibilmente il riarrangiamento dello stesso locus sull'altro cromosoma. Viceversa, se il primo allele fallisce, il secondo procede alla ricombinazione. Si ha esclusione allelica, cioè la catena pesante deriva da un solo dei due alleli ereditati (mantenimento della specificità clonale). Se entrambi gli alleli falliscono la cellula va in apoptosi. Infine, il pre-BCR stimola prima la proliferazione e poi la ricombinazione dei geni della catena leggera e inibisce l'espressione della catena sostitutiva (catena Vpre-B + λ5). I **linf pre-B** iniziano il riarrangiamento delle catene leggere k, se falliscono o generano anticorpi autoreattivi procedono con le catene λ (esclusione isotipica della catena leggera), se falliscono ancora vanno in apoptosi. Se hanno successo esprimono una **IgM completa** e diventano **linf B**

immaturi. Il recettore BCR completo esprime un segnale di sopravvivenza per la cellula e inibisce l'espressione di RAG, ponendo fine ai riarrangiamenti. I linf B immaturi non proliferano, ma si differenziano in risposta agli antigeni.

I **linf B immaturi fortemente autoreattivi** a livello del midollo osseo subiscono **editing recettoriale** o **delezione clonale**. Quelli non fortemente autoreattivi lasciano quindi il midollo osseo, entrano nella polpa rossa e poi nella polpa bianca della milza, dove completano la maturazione. I precursori dei linf B follicolari usano lo stesso segmento VDJ per formare la stessa regione variabile della catena pesante di due isotipi distinti, **IgM e IgD** (mediante splicing alternativo dello stesso trascritto con i due rispettivi segmenti C). I linf acquisiscono quindi competenza funzionale e capacità di ricircolare, quindi diventano **linf B maturi**. Alcuni linfociti rimangono nella milza diventando linf BMZ. Da questo momento in poi il riconoscimento dell'antigene con alta affinità non causa più editing recettoriale/selezione negativa, ma induce la proliferazione e la differenziazione, quindi la **risposta immunitaria umorale**. A questo punto i linf maturi naive lasciano la polpa bianca e migrano nei tessuti linfoidi attraverso le HEV. Le molecole che determinano la migrazione dei linf B immaturi nei linfonodi sono la linfotossina di membrana LTβ, il TNF (se overespressi inducono la formazione dei follicoli) e la chemochina dei linfociti BLC (prodotta dalle cellule stromali del linfonodo), CXCL13 (per restare nell'area B). Se non incontrano il proprio antigene i linf B maturi muoiono nel giro di pochi mesi. Una volta attivati i linf B effettori lasciano i linfonodi secondo il meccanismo della S1P.

ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI B. In seguito al legame del linf naive all'antigene si ha una grandissima **proliferazione** (x5000 cellule in una settimana, che producono 10^12 molecole di anticorpo al giorno). Alcune cellule possono subire **switch isotipico e maturazione dell'affinità**. Gli **antigeni proteici** devono essere internalizzati dai linf B ed esposti ai linf T helper follicolari, che guidano la maturazione classica e la risposta B, per cui sono detti antigeni **T-dipendenti**. Questo avviene perché sono antigeni monovalenti e non possono indurre una efficace aggregazione dei BCR. Le plasmacellule generate dalla risposta T-dipendente migrano dal centro germinativo al midollo osseo, dove sopravvivono per molti anni, garantendo una protezione immediata. E' nell'ambito della risposta T-dipendente che si verifica lo switch isotipico e la maturazione dell'affinità. I linf B follicolari sono T-dipendenti. **Antigeni multivalenti** non richiedono l'intervento dei linf T helper, quindi sono detti antigeni **T-indipendenti**. Questo avviene perché gli antigeni multivalenti inducono efficacemente l'aggregazione dei BCR. I linf B attivati in maniera T-indipendente si dividono in plasmacellule effettrici e linf della memoria. I linf B1 e BMZ sono T-indipendenti.

Vie di incontro dell'antigene: antigeni solubili inferiori a 70 kDa passano dai vasi linfatici afferenti, al seno sottocapsulare, ai condotti reticolari, direttamente alle aree B. Antigeni di grandi dimensioni, microbi e complessi antigene-anticorpo, sono catturati dai macrofagi del seno sottocapsulare. Quelli che sfuggono o sono troppo grandi sono catturati dalle cellule dendritiche della zona midollare. Immunocomplessi possono essere recepiti tramite recettore del complemento CR2 da linf BMZ e DC follicolari. Patogeni in circolo sono catturati da DC plasmacitoidi. Antigeni polisaccaridici sono catturati dai macrofagi. In tutti questi casi **l'antigene è integro, non processato**. In seguito al legame con il BCR l'antigene viene internalizzato e, se proteico, processato e presentato ai linf T.

Il legame del BCR all'antigene non è di solito sufficiente all'attivazione. Il **corecettore CR2** (insieme a CD19 e CD81) riconosce frammenti del complemento, in particolare C3d, legati all'antigene. I **Toll-like receptors** che riconoscono PAMP microbici possono attivare i linf B direttamente o indirettamente (cellule mieloidi possono citochine APRIL e BAFF che promuovono le risposte B T-indipendenti). Il linf B attivato va incontro a cambiamenti: entra in fase G1, cresce, esprime proteine antiapoptotiche, MHC II, costimolatore B7 e nuovi recettori per chemochine e citochine. Antigeni multivalenti attivano immediatamente la risposta B, mentre antigeni proteici inducono la sopravvivenza e l'endocitosi dell'antigene per la presentazione ai linf T.

RISPOSTA T-DIPENDENTE (MATURAZIONE CLASSICA DEI LINF B). Linf B e T riconoscono lo stesso antigene e iniziano ad interagire: **i linf T CD4+ a livello delle aree T dei linfonodi riconoscono l'antigene**

processato dalle DC, mentre i linf B a livello dei follicoli riconoscono l'antigene nella sua forma nativa. Le due popolazioni migrano e si incontrano ai margini del follicolo, dove può avere inizio la risposta primaria (plasmacellule a breve vita). Alcuni linf B e T helper follicolari tornano nel follicolo, dove generano il centro germinativo, per dare origine alla risposta specializzata (plasmacellule più efficaci a lunga vita).

I linf B e T specifici per lo stesso antigene hanno frequenza di 1 / 10^5 o 10^6, quindi per potersi incontrare una volta attivati **migrano gli uni verso gli altri "scambiandosi" i recettori per le chemochine**. I linf T esprimono CXCR5 e si muovono verso i follicoli, mentre i linf B esprimono CCR7 e migrano verso le aree T, inoltre CD69 impedisce l'espressione del recettore per la S1P, aumentando la ritenzione dei linf B nel linfonodo. Il **linf B** riconosce un epitopo conformazionale, lo stesso che verrà riconosciuto dalle Ig circolanti, e **presenta l'antigene a uno o più linf T helper** che riconoscono ciascuno un epitopo lineare. Questo meccanismo spiega **l'effetto aptene-carrier**: un aptene (piccola molecola) da solo non è immunogeno, ma se legato ad una proteina-carrier può essere riconosciuto dai linf B e presentato ai linf T che permettono la produzione di plasmacellule e la successiva risposta all'aptene da solo. Ogni antigene T-dipendente può essere interpretato come un complesso aptene-carrier. I linf T helper attivati secernono citochine ed esprimono CD40L, che si lega a CD40 sui linf B, quindi tramite i fattori trascrizionali NFAT, NF-kB e AP1 inducono la proliferazione e la secrezione di Ig. L'attivazione dei linf B può avvenire fuori dai follicoli (foci extra-follicolari) o al loro interno (nei centri germinativi).

ATTIVAZIONE EXTRA-FOLLICOLARE: **nei foci extra-follicolari si producono 100-200 plasmacellule a breve vita e con scarsa capacità migratoria, che secernono anticorpi a bassa affinità**, per un contenimento iniziale dell'infezione. Le cellule stimolate da CD40L vanno incontro a switch isotipico. Gli immunocomplessi generati vengono catturati dalle **cellule dendritiche follicolari, che richiamano pochissimi linf B dai foci al follicolo**, per dare origine al centro germinativo.

REAZIONE DEL CENTRO GERMINATIVO: i centri germinativi si sviluppano nei 4-7 giorni successivi all'inizio della risposta, grazie a un numero limitato di linf B attivati che torna dai foci ai follicoli e inizia una **rapida proliferazione** (una duplicazione ogni 6-12 ore, x5000 cellule in 5 giorni). L'interazione CD40-CD40L è fondamentale per la reazione del centro germinativo. I linf T helper follicolari si generano per azione delle APC e dei linf B. L'espressione di Bcl-6 e un debole segnale dal recettore dell'IL-2 inibisce la differenziazione T_H1, 2 o 17, mentre permette la T_H follicolare. L'espressione di ICOS da parte di questi linf T e di ICOS-ligando da parte dei linf B attivati determina il **differenziamento in linf T_H follicolari (stimola IL4 e IL10)**. Questi linf esprimono CXCR5 (per la migrazione nel follicolo), IL-21 (essenziale per gli eventi successivi), IFN e IL-4 (coinvolti nello switch isotipico). Il centro presenta una **zona scura occupata da linf B proliferanti, detti centroblasti** (linfociti di grandi dimensioni), mentre **i linf B generati, detti centrociti, vanno incontro a differenziamento e selezione nella zona chiara**. La zona chiara è costituita dai prolungamenti citoplasmatici delle **cellule dendritiche follicolari FDC**, a cui si legano, interagendo, centrociti e linf T helper follicolari. Le FDC esprimono recettori per il complemento (CR1, CR2) e per l'Fc, ma non sono di origine midollare e non esprimono MHC II. Bcl-6 sopprime gli inibitori del ciclo cellulare, il fattore pro-apoptotico p53 e il fattore di differenziamento Blimp-1.

MATURAZIONE DELL'AFFINITA' ANTICORPALE. Nei centroblasti, i linf B che stanno proliferando nella zona scura, **gli esoni V** (circa 700 nucleotidi) **vanno incontro a mutazioni puntiformi**, circa 1 per ogni divisione (**ipermutazione somatica**), raggiungendo fino al 5% di divergenza rispetto alla linea germinale (oltre 10 sostituzioni aminoacidiche). Le mutazioni si concentrano nelle CDR e sono più abbondanti nelle IgG che nelle IgM. Le mutazioni sono introdotte dalla citosina deaminasi AID (C→U→T), insieme a uracil-N-glicosilasi e un sistema che genera errori ai siti di deaminazione. Segue il processo di **selezione positiva dei soli linf B le cui Ig hanno subito un aumento dell'affinità per l'antigene**. L'antigene può essere presente nella zona chiara del centro germinativo **in forma solubile o legato alle FDC** (grazie a recettori dell'Fc e del complemento). I linf B (centrociti) ad alta affinità ricevono un segnale di sopravvivenza dall'antigene, anche se presente a basse concentrazioni: tramite l'espressione di Bcl-2 antiapoptotico, tramite il sistema CD40-CD40L in seguito

all'endocitosi e alla presentazione dell'antigene ai linf T helper follicolari, tramite gli inibitori endogeni del recettore Fas che proteggono dall'apoptosi a cui sono destinati gli altri linf B. Siccome durante la risposta la concentrazione di antigene diminuisce, vengono selezionati linf B con affinità sempre maggiore. **L'affinità può aumentare di decine o centinaia di volte** in 2-3 immunizzazioni. I centrociti selezionati possono andare incontro a un **ulteriore switch isotipico**, poi escono dal centro germinativo e si differenziano in linf B memoria o in plasmacellule secernenti anticorpi.

SWITCH ISOTIPICO: i linf B possono **cambiare la regione costante delle Ig mantenendo inalterata la regione variabile**. Lo switch è **regolato da citochine** prodotte dai linf T helper (IFN → IgG, IL-4 → IgE) o da altre cellule mieloidi, in base alla sede anatomica (fattore di crescita trasformante TGF-β, citochine della famiglia del TNF → IgA a livello delle mucose). Lo switch è un processo di ricombinazione in cui l'esone VDJ viene posto accanto a un nuovo esone C. Gli esoni C possiedono a monte delle **regioni di scambio** (1-10 kb, ricche in GC). Lo switch inizia con la sintesi dei **trascritti germinativi** (esone I + regione di scambio + esone C scelto). La bolla di trascrizione lascia dell'ssRNA che viene attaccato dall'AID. Un enzima detto uracil N-glicosilasi rimuove a questo punto i residui di uracile creati da AID generando siti abasici che vengono eliminati dall'endonucleasi Ape1. I "buchi" su entrambe le regioni di scambio permettono la formazione di DSB che causano la delezione del DNA interposto e la giunzione delle terminazioni.

PLASMACELLULE. Durante le risposte T-indipendenti e le fasi precoci delle T-dipendenti si originano **plasmacellule a breve sopravvivenza**, che si localizzano negli organi linfoidi secondari e negli organi non linfoidi periferici. Durante la reazione del centro germinativo si generano plasmablasti, che poi migrano nel midollo osseo per differenziarsi in **plasmacellule a lunga sopravvivenza**. Queste plasmacellule non migrano attivamente, ma secernono anticorpi per mesi o anni dopo l'infezione (metà degli anticorpi circolanti sono il prodotto di queste plasmacellule, che forniscono la difesa immediata ad una seconda invasione). Le plasmacellule hanno dimensioni maggiori dei linf B e RE e apparato di secrezione molto più sviluppato. Mediante splicing alternativo (eliminazione della porzione transmembrana dell'Ig) generano anticorpi solubili. Il fattore trascrizionale Blimp-1 sopprime Bcl-6 e insieme a IRF-4 induce il differenziamento dei linf B in plasmacellule. **LINFOCITI B MEMORIA**. Alcuni linf B attivati nei centri germinativi possono sopravvivere a lungo in assenza di antigene grazie ad alti livelli di proteina antiapoptotica Bcl-2. Alcuni di questi restano negli organi linfoidi, altri ricircolano tra sangue e organi linfoidi. I linf B memoria esprimono **BCR ad alta affinità e di isotipi diversi dalle IgM**. Per la generazione di linf B memoria sono necessari i linf T helper, quindi sono stati sviluppati vaccini coniugati (secondo il modello aptene-carrier) con l'antigene vero e proprio coniugato ad una proteina carrier. Le cellule memoria sembrano avere bassi livelli di IRF-4. Il processing dell'RNA determina se gli esoni transmembrana e citoplasmatico saranno o meno inclusi nell'mRNA finale

RISPOSTA T-INDIPENDENTE. Operata da linf BMZ e linf B a livello di milza, peritoneo, midollo osseo e mucose, contro polisaccaridi, glicolipidi, lipidi e acidi nucleici, presentati da macrofagi della zona marginale. La risposta consiste nella **secrezione di anticorpi a bassa affinità, principalmente IgM** (in minor parte IgG e IgA), **e la conseguente attivazione del complemento**. Gli antigeni T-indipendenti sono in genere multivalenti, quindi inducono efficacemente l'aggregazione di BCR, inoltre attivano il complemento. Le citochine prodotte da cellule diverse dai linf T (TGF) possono indurre lo **switch isotipico** dei linf B. Gli antigeni T-indipendenti più comuni sono i polisaccaridi della parete batterica e i lipidi ossidati della loro membrana. Contro questi antigeni, ma apparentemente senza alcuna esposizione ad essi, sono presenti gli **anticorpi naturali**, a bassa affinità, tra cui gli anticorpi anti-AB0. Anche la risposta T-indipendente **può generare una protezione a lungo termine**, con risposte secondarie più rapide ed efficaci. Le risposte T indipendenti di tipo 1 ottengono il secondo segnale da recettori dell'immunità innata (TLR riconosce LPS), quelle di tipo 2 sono possibili per estesa aggregazione del BCR (polisaccaridi).

FEEDBACK ANTICORPALE. **Le IgG secrete possono inibire la sintesi di anticorpi, legandosi simultaneamente all'antigene legato ad una Ig di membrana e ad un recettore per l'Fc**. Il recettore per l'Fc possiede domini inibitori ITIM che reclutano delle fosfatasi in prossimità del BCR, impedendo la trasduzione del segnale.

Probabilmente nelle fasi precoci della risposta le IgM inducono l'amplificazione della produzione di anticorpi mediante l'attivazione del complemento, mentre **nelle fasi tardive** le IgG inducono la riduzione della produzione mediante il recettore per l'Fc. C'è anche un altro recettore inibitorio sui linf B, il CD22.

IMMUNITA' UMORALE

L'immunità umorale, **mediata dagli anticorpi secreti**, è responsabile della **difesa da microorganismi extracellulari, alcuni virus e tossine**. Gli anticorpi svolgono la loro funzione lontano dal sito in cui sono prodotti, perché possono circolare nel sangue, attraversare gli epiteli delle mucose e la placenta. Ad un secondo incontro con l'antigene, gli elevati livelli di anticorpi circolanti forniscono la prima protezione dall'infezione, mentre l'attivazione dei linf B memoria assicura una risposta secondaria più efficace. Isotipi diversi di Ig svolgono funzioni effettrici diverse e per ogni risposta si realizza lo switch verso l'isotipo più efficace. La neutralizzazione non coinvolge le regioni costanti dell'Ig, quindi è indipendente dall'isotipo. Il legame di molti anticorpi ad un antigene multivalente induce l'aggregazione degli Fc, che causa **l'attivazione del complemento** e dei **recettori per l'Fc sui fagociti**.

Legando i microrganismi e le tossine, gli anticorpi **impediscono i legame con i target cellulari** degli agenti infettivi, **neutralizzandone l'infettività**. Questo può avvenire per impedimento sterico (nascondendo i siti necessari all'interazione) o allosterico (alterando la superficie del microrganismo). Gli anticorpi neutralizzanti del siero sono le IgG, quelli delle mucose sono le IgA. I microrganismi che variano i propri antigeni di superficie sono difficilmente neutralizzabili. Un altro meccanismo dell'immunità umorale è l'**opsonizzazione**: le opsonine (IgG e frammenti del complemento, come C3b), rivestono il patogeno e possono essere legate con alta affinità dai recettori delle opsonine (FcR e CR) presenti sulla superficie dei fagociti, **aumentandone la capacità fagocitica**. Ci sono recettori per l'Fc delle IgG, IgE e IgA. Le IgG possono opsonizzare un microrganismo, legare il recettore a bassa affinità FcγRIIIA espresso dalle **cellule NK** e indurre **citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente ADCC**. Gli anticorpi circolanti non legati ad un microrganismo non possono attivare questa via. Le **IgE che opsonizzano un elminta** si legano al recettore ad alta affinità FcεR, espresso da eosinofili e mastociti, causandone la degranulazione (liberazione della proteina basica maggiore).

I **recettori per l'Fc delle IgG** sono detti FcγR, si dividono in gruppi I, II e III in base all'affinità di legame con le IgG. La diversa specificità è dovuta alle diversità della catena α, responsabile del legame con il complesso IgG-antigene. La catena α è generalmente associata ad altre catene deputate alla trasduzione del segnale. Le IgG2 sono scarsamente legate dai recettori per l'Fc, le IgG4 non lo sono affatto. Il legame di antigeni opsonizzati ai recettori per l'Fc, e in particolare **il cross-linking di tanti FcγR, trasduce segnali** (simili a quelli di BCR e TCR) **che causano l'internalizzazione dell'antigene in vescicole fagocitiche e altre risposte** (citochine…).

- **FcγRI**: recettore ad alta affinità (kd = 10^-8 – 10^-9) per le IgG1 e 3, espresso da macrofagi e neutrofili. La catena α contiene 3 domini Ig ed è associata a due catene γ (omologhe a ζ), dotate di domini ITAM per la trasduzione. Il recettore è costantemente saturato da IgG e l'aggregazione è necessaria per l'attivazione. L'IFN stimola sia lo switch verso IgG1 e 3, sia la produzione di FcγRI sui fagociti.
- **FcγRII**: recettore a bassa affinità (kd = 10^-6) per IgG1 e 3, ne esistono 3 isoforme, A, B e C. A e C sono espresse da fagociti e cellule NK e possiedono domini ITAM, mentre la B è un recettore inibitorio. FcγRIIB è espresso da linf B, DC, macrofagi, neutrofili e mastociti, forse controbilancia l'attivazione da parte di altri FcR e altri stimoli.
- **FcγRIII**: recettore a bassa affinità per le IgG, simile a FcγRII, con due isoforme. La A è espressa da cellule NK ed è associata a omodimeri o eterodimeri di catene con domini ITAM (γ e ζ). La B è espressa da neutrofili ma non sembra essere coinvolta nella fagocitosi.

Immunità neonatale. Per molti mesi dopo la nascita la principale linea di difesa è fornita dagli anticorpi materni. Il trasporto transepiteliale delle **IgA nel latte** è permesso dal recettore polivalente per le Ig. Il

trasporto delle **IgG materne attraverso la placenta** e l'epitelio intestinale è permesso da FcRn, recettore neonatale per Fc (nell'adulto protegge dal catabolismo le IgG plasmatiche).

SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Scoperto e definito come una componente termolabile che aiutava (complementava) la lisi batterica mediata da anticorpi. E' costituito da **proteine solubili e di membrana, presenti nel torrente circolatorio sotto forma di precursori inattivi**. L'attivazione del complemento è una **proteolisi sequenziale** di elementi (detti zimogeni) che porta all'assemblaggio di complessi enzimatici dotati di attività proteolitica. Per garantire un'azione mirata gli elementi attivati si legano covalentemente ai microrganismi, agli immunocomplessi e alle cellule apoptotiche, che verranno lisati, mentre le cellule dell'ospite esprimono proteine di membrana che impediscono l'attivazione del complemento.

Tramite 3 diverse vie (classica, alternativa, lectinica) si genera un complesso, la **C3 convertasi**, capace di clivare l'elemento C3 in due frammenti, C3a e C3b. Quando viene tagliato, il frammento C3b subisce modificazioni del dominio tioesterico che espongono il gruppo tioesterico reattivo. C3b può quindi legarsi covalentemente alla superficie di ogni cellula. L'attivazione può portare alla deposizione di centinaia o migliaia di frammenti di C3b sul bersaglio. Quando C3b si lega al bersaglio ne stimola la fagocitosi, induce l'infiammazione e richiama la **C5 convertasi**. Questa divide C5 in C5a e C5b, contribuendo all'infiammazione e alla generazione di pori nella membrana del bersaglio. La componente C7 del risultante complesso C5b,6,7 è idrofobica e si inserisce nel doppio strato fosfolipidico della membrana dove diventa un recettore ad alta affinità per C8. C8 è una proteina formata da tre diverse catene, una delle quali lega il complesso C5b,6,7 e forma un eterodimero con la seconda catena; la terza si inserisce invece nel doppio strato fosfolipidico. Il complesso così creato, C5b-8 ha limitata capacità di lisare le cellule. C9 (simile alla perforina) polimerizza in presenza del complesso e forma pori (diametro di 100 A) che fanno lisare la cellula. Il complesso finale è detto **MAC, membrane attack complex**.

1- **Via alternativa**: **in assenza di anticorpi**. C3 subisce un basso e continuo clivaggio detto tick-over, che genera basse quantità di C3b. C3b può non legarsi ed essere neutralizzato, oppure può legarsi ad un bersaglio e al fattore B. Il fattore B legato viene a sua volta spezzato da una serina proteasi plasmatica detta fattore D: questo genera un frammento Ba e un frammento Bb che rimane attaccato a C3b. Il complesso C3bBb è la C3 convertasi che cliva massivamente C3. Anche le vie classica e lectinica possono amplificarsi tramite C3bBb. Se il C3bBb si forma sulle cellule dell'ospite viene degradato. La properidina può stabilizzare il complesso. La C5 convertasi è formata da Bb + 2 C3b e può clivare C5. La via alternativa è la più antica e probabilmente la principale, perché difetti genetici in essa si associano a un grande aumento della suscettibilità alle infezioni.
2- **Via classica**: **mediata da anticorpi**. Si avvale del complesso multimerico C1, costituito da C1q, r e s. C1q è un esamero con 6 teste globulari connesse ad uno stelo. Le teste possono interagire con l'Fc e servono almeno due Fc per permettere l'attivazione. Le IgM pentameriche possono legare più di un C1q alla volta (esclusivamente quando legano l'antigene), quindi sono le più efficaci. C1r e C1s sono serina proteasi che formano un tetramero. In seguito all'attivazione C1r cliva C1s, C1s cliva C4 (dando C4a e C4b), C4b si lega covalentemente alla superficie del bersaglio. C2 si lega a C4b e viene tagliata, quindi rimane C4b2a, la C3 convertasi della via classica. Il complesso C4b2a3b agisce da C5 convertasi.
3- **Via lectinica**: **mediata da collectine** (MBL lectina legante mannosio e ficoline), simili a C1q, **e MASP serine proteasi associate alle MBL**, simili a C1r e C1s. Le collectine possiedono un dominio simile al collageno che permette l'assemblaggio di strutture a tripla elica. L'interazione **con polisaccaridi microbici** causa l'attivazione delle MASP e il clivaggio di C4 e C2, quindi la via lectinica ricalca quella classica. Esiste una insolita via anticorpo indipendente della via classica nelle infezioni da pneumococco. I macrofagi splenici marginali esprimono una lectina di superficie detta SIGNR1 che lega polisaccaridi pneumococcici e C1q; il legame del batterio o del polisaccaride alla lectina attiva la via classica e promuove la copertura dello pneumococco con C3b.

Recettori per le componenti del complemento

- **CR1**: stimola la fagocitosi di microrganismi opsonizzati da C3b e C4b. E' espresso da tutte le cellule ematopoietiche. Il legame degli immunocomplessi agli eritrociti permette il loro trasporto a fegato e milza, dove vengono eliminati. CR1 contribuisce all'attivazione del complemento.
- **CR2**: recettore per C3d, C3dg e C3b inattivo. E' espresso dai linf B in un complesso trimerico che potenzia la risposta all'antigene. E' espresso dalle DC follicolari e favorisce l'intrappolamento degli immunocomplessi nei centri germinativi.
- **CR3**: recettore per C3b inattivo, è un'integrina espressa da fagociti, mastociti e cellule NK. Può promuovere la fagocitosi dei microrganismi opsonizzati, favorire il legame con il microrganismo anche in assenza di antigene e il legame dei leucociti all'endotelio tramite il legame con ICAM-1.
- **CR4**: integrina con catena β identica a CR3, ma catena α diversa. Funzioni simili a CR3. Espressa soprattutto sulle DC.
- **CRIg**: recettore per il complemento della famiglia della Ig espresso sulla superficie dei macrofagi residenti nel fegato (cellule di Kupffer), induce la fagocitosi di microrganismi opsonizzati da C3 (attivo o inattivo)
- **Recettori regolatori** che coadiuvano o inibiscono il legame e la trasduzione del segnale: C1 inhibitor, fattore I, fattore H, proteina legante C4 (proteine plasmatiche), fattore accelerante la degradazione, proteina cofattoriale di membrana, CD59 (sulla membrana di cellule epiteliali, endoteliali, ematiche e leucociti).

Il complemento è strettamente regolato da proteine circolanti e di membrana dette **RCA, regolatori dell'attività del complemento**. Se le serina proteasi C1r e C1s si legano ad un anticorpo in fase fluida C1 INH (C1 inhibitor) diventa il loro substrato e ne causa la dissociazione da C1q, rendendole innocue. L'assemblaggio di C3 convertasi e C5 convertasi è inibito da proteine espresse sulla superficie di cellule di mammifero (ma non dai batteri), che si legano ai frammenti C3b e C4b. Le stesse proteine coadiuvano il fattore I (una serina proteasi plasmatica) a clivare C3b, lasciando dei frammenti inattivi (C3d, C3 dg e C3b inattivo). Per evitare la lisi di cellule adiacenti al bersaglio esistono proteine plasmatiche S che impediscono l'inserimento del complesso C5b,6,7 nella membrana e proteine di membrana CD59 che si associano a C5b,6,7,8 impedendo l'associazione di C9 e quindi la formazione del MAC completo.

Il complemento agisce in vari modi. 1- I suoi frammenti **opsonizzano il microrganismo** e vengono recepiti da CR che aumentano la capacità fagocitica o la citotossicità (insieme a IgG che stimolano FcγR). 2- I frammenti C3a, C4a e soprattutto C5a inducono **un'infiammazione acuta** agendo su mastociti (mediatori vasoattivi), neutrofili (ROS) e cellule endoteliali (permeabilità dei vasi). 3- **citolisi mediata dal complesso MAC**, efficace solo su pochi batteri dotati di parete sottile. 4- Se gli immunocomplessi sono abbondanti possono interagire e precipitare sulla parete dei vasi, causando danno tissutale. I frammenti del complemento possono impedire stericamente queste interazioni, favorendo la **solubilizzazione degli immunocomplessi e la loro eliminazione**. 5- **aumento dell'efficienza dell'immunità umorale**: il CR2 riconosce il C3d associato alla superficie del patogeno e agisce da corecettore per la trasduzione di segnale del BCR, inoltre i frammenti del complemento favoriscono la cattura di antigeni da parte delle DC follicolari nei centri germinativi. Difetti genetici nella sintesi delle proteine del complemento, dei suoi recettori e regolatori sono alla base di varie malattie. Anche quando è correttamente attivato, il complemento **può causare significativi danni tissutali**, come la malattie da immunocomplessi (precipitazione di immunocomplessi sulla parete dei vasi → danno endoteliale causato dal complemento → trombosi intravascolare → coagulazione → danno ischemico).

I microrganismi hanno evoluto diversi **meccanismi per sfuggire al sistema del complemento**. Batteri gram positivi e alcuni funghi hanno sviluppato una spessa parete. Alcuni patogeni possono indurre un accumulo locale di proteine regolatorie, oppure produrre proteine che le mimano oppure che inibiscono il processo infiammatorio.

IPERSENSIBILITA'

Ipersensibilità	Meccanismi patogeni	Danno tissutale e malattia	Effetto in
I: ipersensibilità immediata	IgE	Mastociti e mediatori	Pochi minuti
II: mediata da anticorpi	IgM o IgG rivolti verso antigeni di superficie o matrice extracellulare	Opsonizzazione e fagocitosi delle cellule, reclutamento dei leucociti ad opera di complemento e recettori per l'Fc. Ab attaccano prot	2-6 ore
III: mediata da immunocomplessi	Complessi IgM o IgG + antigene	reclutamento dei leucociti ad opera di complemento e recettori per l'Fc	2-6 ore
IV: mediata da linf T	CD4+ - ipersensibilità ritardata CD8+ - citolisi cellulo-mediata	-Attivazione macrofagica e infiammazione -Uccisione diretta dei bersagli e infiammazione	Infiammazione in 2-6 ore, ipersensibilità ritardata in 24-48 ore

Nell'**ipersensibilità immediata** si ha attivazione T_H2 e produzione di IgE che si legano ai recettori per l'Fc dei mastociti. Non appena incontrano l'antigene le IgE inducono degranulazione dei mastociti, liberando amine vasoattive e mediatori lipidici (prostaglandine e leucotrieni derivati dall'acido arachidonico) che hanno effetto in pochi minuti. Le citochine prodotte (TNF) hanno effetto tardivo (6-24 ore). Gli effetti principali sono la vasodilatazione e la broncocostrizione. Le sindromi più comuni sono rinite allergica, congiuntivite, asma bronchiale, allergie alimentari, anafilassi. Episodi ripetuti di ipersensibilità immediata possono portare a malattie allergiche croniche come eczema, rinite allergica e asma allergico. L'anafilassi è caratterizzata da edema in molti tessuti e crollo della pressione sanguigna a causa della vasodilatazione. Gli allergeni attivano i mastociti in molti tessuti, e i mediatori guadagnano così accesso al letto vascolare. Il calo del tono vascolare e la fuga di plasma risultano in un crollo pressorio che porta a shock anafilattico spesso fatale. Gli effetti cardiovascolari sono accompagnati da costrizione delle vie aeree, edema laringeo, ipermotilità intestinale e orticaria. Il trattamento d'elezione è l'epinefrina sistemica, che contrasta gli effetti broncocostrittori e vasodilatatori.

Gli **anticorpi** possono riconoscere antigeni espressi su cellule oppure nella matrice cellulare (II), oppure formare immunocomplessi che precipitano sulla parete dei vasi (III). Successivamente reclutano i leucociti che causano danno tissutale e danno all'endotelio (vasculiti). Gli anticorpi possono anche interferire con l'attività di alcune cellule senza causare danno tissutale, ad esempio attivando o inibendo i recettori di membrana a cui si legano. Le manifestazioni di ipersensibilità di tipo II sono emolisi, emorragie, vasculiti, leucopenia, trombocitopenia … Le malattie di tipo III sono lupus eritematoso sistemico, vasculiti, glomerulonefriti, miocarditi… Alcune **malattie mediate dai linf T** sono diabete mellito insulino-dipendente (di tipo I), artrite reumatoide, malattie infiammatorie dell'intestino, encefalomieliti. Le malattie da ipersensibilità ritardata si manifestano con infiltrati cellulari perivascolari ed edema. Nella miastenia gravis gli autoanticorpi contro il recettore colinergico della placca motrice muscolare bloccano l'azione dell'acetilcolina causando paralisi.

IMMUNODEFICIENZE. **Deficit dei linfociti B e dell'immunità innata** espongono alle infezioni di batteri piogeni (generatori di pus), mentre **deficit dei linf T** espongono a infezioni virali e di microbi intracellulari e a tumori di origine virale. I deficit possono avvenire in vari punti dello sviluppo dei linfociti, a carico di vari geni. Le immunodeficienze gravi combinate SCID possono essere legate al cromosoma X oppure essere autosomiche recessive (geni di ADA, di PNP, di RAG), sono caratterizzate da diminuzione delle popolazioni di linf B e T e del livello di Ig nel siero. Immunodeficienze congenite dovute ad anomalie nei linfociti: sindrome iper-IgM legata al cromosoma X, deficit selettivo di isotipi Ig, sindrome del linfocita nudo (difetti nell'MHC II),

deficit di espressione o trasduzione di segnale del TCR. Immunodeficienze congenite dovute ad anomalie nell'immunità innata: defict di adesione leucocitaria (tipo 1 – integrine, tipo 2 – selectine), deficit nelle proteine del complemento (C2, C3, C4), malattia granulomatosa cronica (mancano i ROS dei fagociti), alterazioni nei lisosomi e nei granuli dei leucociti. Immunodeficienze secondarie (acquisite): infezione da HIV (progressiva diminuzione dei linf T CD4+), malnutrizione proteico-calorica (blocco della maturazione di linfociti), trattamenti radio e chemioterapici (riduzione dei precursori linfocitari nel midollo osseo), metastasi tumorali nel midollo osseo, splenectomia (ridotta fagocitosi).

Il **virus dell'HIV** si lega ai linf T attraverso un recettore per le chemochine e il corecettore CD4, quindi l'envelope si fonde con la membrana e l'RNA virale entra nella cellula, dove viene retrotrascritto a DNA e **si integra nel genoma dell'ospite**. La stimolazione del linfocita da parte di citochine induce la trascrizione del DNA virale, quindi si produce nuovo RNA virale e nuovi capsidi che si assemblano in virus che escono dalla cellula. In seguito all'infezione di linf T e cellule dendritiche a livello delle mucose **il virus viene trasportato agli organi linfoidi**, dove si manifesta l'infezione acuta e la disseminazione in tutto l'organismo. L'infezione acuta è tenuta sotto controllo da anticorpi anti-HIV e linf T citotossici specifici per HIV. Tuttavia **il virus rimane latente** e con un basso tasso di replicazione in alcune cellule (DC follicolari e tessuti linfoidi). In seguito a nuove infezioni microbiche le citochine prodotte stimolano il virus a riprendere la replicazione, distruggendo i tessuti linfoidi e abbattendo la popolazione di linf T CD4+. Lo **stadio di immunodeficienza** che deriva dall'infezione è l'**AIDS**. Il titolo virale è molto alto in fase acuta, ma torna basso dopo 10-12 settimane e può rimanere quasi a zero per molti anni. Quando riprende a replicarsi il virus cresce esponenzialmente. I linf T CD4+ crollano durante l'infezione acuta, poi in parte si riprendono, ma continuano a diminuire progressivamente per tutta la fase di latenza. Quando scendono sotto una certa soglia l'individuo corre il rischio di sviluppare malattie opportuniste e AIDS.

TOLLERANZA IMMUNOLOGICA E AUTOMMUNITA'

Per tolleranza immunologica si intende la **mancata risposta ad un antigene causata dalla precedente esposizione ad esso**. Questi antigeni sono detti **tollerogeni** o tollerogenici (non immunogeni) e causano inattivazione o eliminazione dei linfociti specifici per essi. Un antigene può essere immunogeno o tollerogeno in base alla presenza o assenza di infiammazione. L'individuo sviluppa naturalmente la tolleranza al self, se questa viene a mancare si hanno reazioni e malattie autoimmuni. Tra tutti i linf prodotti alcuni sono specifici per il self, ma vengono uccisi, inattivati o indotti a cambiare la loro specificità. La tolleranza è antigene-specifica, cioè per ogni singolo clone autoreattivo. Prima si realizza la tolleranza centrale, a livello di timo e midollo osseo, ma se alcuni linf autoreattivi sopravvivono c'è la tolleranza periferica che ne previene l'attivazione. La **tolleranza centrale** è data dalla presentazione di antigeni self ubiquitari o ampiamente espressi **ai linf immaturi**. La **tolleranza periferica** è data dalla presentazione di antigeni self esclusivi dei tessuti periferici o della vita adulta **a linf già maturi**. La tolleranza periferica è coadiuvata dai **linf T regolatori**. Alcuni antigeni self vengono sequestrati da barriere anatomiche (testicoli, occhi), altri vengono ignorati, quindi non causano risposta. Dosi elevate di antigene non self somministrate in assenza di adiuvanti tendono a indurre tolleranza, a causa della **mancata produzione di costimolatori** da parte delle APC. Generare tolleranza aiuterebbe a curare patologie autoimmuni o allergiche e a prevenire il rigetto degli organi trapiantati. [approfondimento su come si è scoperto]

TOLLERANZA DEI LINFOCITI T (CD4+ HELPER). 1- **Tolleranza centrale**. Durante la maturazione timica molti dei **linf T immaturi che riconoscono antigeni self ad alta affinità vengono eliminati, quelli che sopravvivono diventano T regolatori**. L'antigene self è presente nel timo a causa dell'espressione in loco oppure del **trasporto dal sangue**. La selezione negativa avviene a livello della corticale timica per i linf doppio positivi, nella midollare per i singolo positivi. Le cellule epiteliali della midollare timica esprimono **AIRE, autoimmune regulator**, coinvolto nel rimodellamento della cromatina e nel processamento di mRNA, che **permette l'espressione di molte proteine tessuto-specifiche**. Mutazioni in AIRE rendono impossibile la selezione

negativa, causando sindrome poliendocrina autoimmune. I linf T regolatori lasciano il timo e inibiscono le risposte ad antigeni self nei tessuti periferici. La loro formazione forse è dovuta all'affinità di legame per l'antigene, all'APC o a citochine specifiche.

2-**Tolleranza periferica**. Si realizza tramite i fenomeni di anergia, inibizione e delezione dei cloni autoreattivi, gli stessi meccanismi coinvolti nella tolleranza ad antigeni non self. A- **Anergia**: in assenza di segnali costimolatori / dell'attivazione dell'immunità innata i linf T diventano non responsivi e sopravvivono per giorni o settimane in stato di non responsività. La mancata attivazione è dovuta a minore espressione dei TCR, alla maggiore degradazione (poliubiquitinazione mediata da ligasi) di proteine legate al TCR o al reclutamento di molecole e recettori inibitori. CTLA-4 è un recettore di B7 della famiglia di CD28, la sua espressione aumenta nei linf T in seguito all'attivazione, per porre fine alla stimolazione continua e quindi alla risposta. CTLA-4 è espresso dai linf T regolatori e blocca l'attivazione dei linf T naive tramite blocco della trasduzione del segnale e riduzione della quota di B7 disponibile. PD-1 è un recettore di PD-L1 e PD-L2 (prodotti da APC) della famiglia di CD28, è coinvolto nel reclutamento di fosfatasi che terminano la risposta CD8+ nei tessuti periferici, mentre non è espresso dai linf T reg. La tolleranza è mediata da CTLA-4 e mancanza di costimolatori. È dovuta ad assenza di IL2 e di formazione di AP1. L'ignoranza clonale è la mancanza di risposta.

B- **Linfociti T regolatori**: sono linf CD4+, CD25+ , che esprimono il recettore dell'IL-2, il recettore inibitore CTLA-4 e il fattore di trascrizione Fox-P3 (indotto da TGF e IL-2). Ci sono **linf T reg timici o naturali**, sviluppati nel timo in seguito a contatto con antigeni self, e **linf T reg periferici adattativi o inducibili**, prodotti nei tessuti periferici in seguito all'incontro senza costimolazione di antigeni self o non self. I linf T reg possono inibire l'attivazione di linf T naive e la risposta effettrice T, l'attivazione dei linf B e la differenziazione delle cellule NK. I meccanismi usati sono la riduzione della capacità stimolatoria delle APC (tramite CTLA-4), il consumo di IL2 e la produzione di citochine immunosoppressive IL10 e TGF. La carenza dei linf T reg o la resistenza dei linf effettori alla loro azione potrebbe contribuire allo sviluppo di malattie autoimmuni e allergiche.

C- **Delezione dei linf T mediante apoptosi**. linfociti T che riconoscono il self senza infiammazione o che sono ripetutamente stimolati muoiono per apoptosi: questo tipo di morte è stata chiamata morte cellulare attivazione-indotta. Nella **via mitocondriale (o intrinseca)** in seguito a determinati segnali il sensore di stress cellulare **Bim** lega le proteine pro-apoptotiche della famiglia Bcl-2 **Bax e Bak**, che formano **pori sulla membrana mitocondriale**, liberando il citocromo c e attivando le caspasi. I linf T che riconoscono antigeni self con elevata affinità attivano la proteina Bim, in assenza di segnali costimolatori mancano le proteine antiapoptotiche, quindi la cellula va in apoptosi. Nella **via estrinseca** dell'apoptosi ligandi omologhi al TNF causano l'aggregazione di recettori che reclutano la procaspasi-8, capace di attivare la via delle caspasi e anche la via intrinseca. I fagociti riconoscono e rimuovono corpi apoptotici e cellule apoptotiche in assenza di infiammazione. **La ripetuta stimolazione dei linf T porta all'espressione dei recettori Fas e dei loro ligandi**, causando la morte delle cellule stesse o di quelle vicine.

Le cellule dendritiche tissutali sono normalmente in uno stato di riposo (immaturo) in cui esprimono poco o nulla costimolatore, in questo stato possono presentare costantemente antigeni self ai linf T, che diventano anergici o si differenziano in T reg. **Tolleranza periferica dei linf T CD8+ citotossici**: 1- induzione dell'anergia in assenza di costimolazione e di linf T helper. 2- recettori inibitori PD-1 (soprattutto per l'esaurimento clonale, cioè l'interruzione della risposta). 3- intervento diretto o indiretto dei linf T regolatori. 4- Apoptosi in presenza di alte concentrazioni di antigene.

TOLLERANZA DEI LINFOCITI B. 1- **Tolleranza centrale**, a livello del midollo osseo per i linf B immaturi. A- **Editing recettoriale**: in caso di forte segnale di attivazione (antigeni multivalenti ad alte concentrazioni) vengono riattivati i geni RAG e si procede ad una nuova ricombinazione VJ sulla catena leggera. B- **Delezione**:

se l'editing fallisce il clone muore per apoptosi. C- **Anergia**: in caso di debole legame con l'antigene il linf B subisce inibizione dell'espressione o blocco funzionale del BCR.

2-**Tolleranza periferica**, per i linf B maturi. A- **Anergia e delezione**: linf che incontrano l'antigene self sono più dipendenti degli altri dai fattori di sopravvivenza, quindi muoiono più facilmente. Se incontrano l'antigene ad alta affinità possono andare in apoptosi attraverso la via mitocondriale. Cloni autoreattivi generati casualmente durante il processo di mutazione somatica possono essere eliminati dai linf T helper tramite Fas- ligando. B- linf B che riconoscono antigeni self a bassa affinità possono essere tenuti sotto controllo da **recettori inibitori, come CD22**. In assenza di secondi segnali questi linf non possono scatenare la risposta. Un altro meccanismo è la perdita dei recettori per le chemochine e l'incapacità di entrare nei follicoli linfatici.

AUTOIMMUNITA'. L'autoimmunità è il **mancato funzionamento della tolleranza**, da distinguere dalle malattie infiammatorie immunomediate (non scatenate da antigeni self). L'autoimmunità è causata da difetti genetici (alterazione della tolleranza) e episodi infettivi o lesioni (afflusso e attivazione di linf autoreattivi), che possono indurre una presentazione degli antigeni incapace di sviluppare tolleranza. Le malattie autoimmuni possono essere sistemiche o organo-specifiche (in base alla distribuzione dell'antigene), sono basate su vari meccanismi effettori (formazione in circolo di immunocomplessi…), sono croniche, progressive e tendono ad autoperpetuarsi (tramite epitope spreading possono liberare nuovi epitopi autoimmuni). I linf T helper sono centrali nell'autoimmunità perché possono indurre reazioni immunitarie cellulo-mediate e produzione di autoanticorpi. Tre aberrazioni immunologiche sono alla base dell'autoimmunità: **carenza di tolleranza o regolazione**, con conseguente squilibrio tra attivazione e controllo dei linfociti autoreattivi; **infiammazione** che stimola la risposta (durante infezioni o lesioni); **anomala presentazione degli antigeni self**, come sovraespressione e persistenza senza eliminazione, oppure esposizione di nuovi epitopi antigenici a causa di alterazioni.

L'autoimmunità è dovuta sia a **fattori genetici** che a **fattori ambientali**. Molti **polimorfismi** su vari classi di geni possono indurre autoimmunità. Il locus più caratterizzato è quello **dei geni MHC** (contribuisce a metà della suscettibilità). Gli alleli sono presenti anche in individui sani, i polimorfismi sono spesso per gli aa della tasca, in certi casi l'associazione non è con un'HLA ma con un altro allele ereditato congiuntamente. Questi MHC potrebbero essere coinvolti nella presentazione di antigeni a linf T patogenetici, oppure nella selezione negativa di linf T autoreattivi o nello sviluppo di linf T reg. Altri polimorfismi, sia protettivi che rischiosi, sono stati identificati in regioni codificanti e non di vari geni, soprattutto di quelli **coinvolti nella risposta immunitaria**: PTPN22 tirosina fosfatasi per la trasduzione, NOD2 sensore citoplasmatico di peptidoglicani, insulina (riduzione dell'espressione timica → diabete di tipo I), CD25 recettore dell'IL2, recettore dell'IL23, ATG16LI proteina coinvolta nell'autofagia. **Alterazioni epigenetiche** potrebbero contribuire allo sviluppo di malattie autoimmuni. **Difetti in singoli geni** possono causare malattie di tipo mendeliano ad alta penetranza: sono i geni coinvolti in tolleranza centrale, tolleranza periferica, generazione e funzione dei linf T reg, anergia, proteine del complemento e recettore inibitore FcγRIIB.

Le infezioni possono determinare la rottura della tolleranza in due modi. 1- **attivazione bystander**, ovvero delle cellule limitrofe, esercitata da APC attivate dall'infezione. I microbi possono anche attivare i TLR e aggirare la tolleranza. 2- **anticorpi rivolti contro antigeni self potrebbero cross reagire con antigeni microbici** (mimetismo molecolare), determinando l'attivazione dei cloni autoreattivi. Tuttavia, alcune infezioni possono proteggere dallo sviluppo dell'autoimmunità. Il microbioma intestinale e cutaneo può influenzare lo sviluppo delle malattie autoimmuni. Anche l'azione ormonale ha un ruolo in questo senso (differenze uomo – donna). Alterazioni anatomiche dei tessuti (dovute a infiammazione, danno ischemico o traumi) possono portare all'esposizione di antigeni self normalmente inaccessibili al sistema immunitario.

IMMUNOLOGIA DEI TRAPIANTI

Il trapianto è il **processo per cui si prelevano da un individuo donatore cellule, tessuti o organi (i "trapianti") che vengono poi trasferiti ad un individuo ricevente o ospite**, per sostituire tessuti e organi danneggiati. Se il trapianto avviene nella stessa sede anatomica del prelievo è detto trapianto **ortotopico**, altrimenti è **eterotopico**. Nello stesso individuo è t. **autologo** (autotrapianto), tra due individui geneticamente identici è t. **singenico**, tra due diversi della stessa specie è t. **allogenico** (allotrapianto, antigeni detti alloantigeni e linfociti e anticorpi detti alloreattivi), tra due specie diverse è t. **xenogenico** (xenotrapianto, xenoantigeni, xenoreattivi). Il trapianto allogenico è il più comune. Il trapianto di cellule ematiche circolanti o plasma è detto **trasfusione**. Il trapianto di cellule o tessuti tra individui geneticamente diversi è sempre seguito da **rigetto** causato dall'immunità adattativa, una reazione infiammatoria che porta alla necrosi del tessuto trapiantato. Il processo è caratterizzato da memoria e specificità ed è mediato dai linfociti. La dimostrazione è avvenuta tramite studio di trapianti cutanei in modelli animali, in cui è visibile un rigetto di primo livello (10-14 giorni dal primo trapianto) e un rigetto di secondo livello (3-7 giorni dal secondo trapianto).

Gli studi sono eseguiti su animali inbred (derivati da ripetuti incroci all'interno della linea parentale): tutti gli animali di un ceppo inbred sono identici e omozigoti per tutti i geni. Consideriamo A e B individui geneticamente diversi (o appartenenti a ceppi inbred distinti). Le **regole dell'immunologia** sono: 1- A → A => non c'è rigetto. 2- A → B => c'è rigetto. 3- genitori diversi (A o B) → prole ((AxB)F1) => non c'è rigetto (ad eccezione del midollo osseo). 4- prole non inbred ((AxB)F1) → genitori (A o B) => c'è rigetto. Da queste regole risulta che **le molecole responsabili del rigetto sono polimorfe** (diverse in individui geneticamente diversi) **ed espresse in maniera codominante** (AB ha sia A, sia B). Per dimostrare quali siano i geni codificanti queste molecole sono stati generati ceppi congenici, ovvero linee geneticamente identiche ad eccezione di un una regione. Sono stati identificati i **geni del complesso maggiore di istocompatibilità MHC** (o HLA antigeni leucocitari umani), responsabili delle reazioni acute di rigetto. I geni MHC sono talmente polimorfi che non esistono due individui A e B i cui geni MHC siano identici. Altri antigeni polimorfi, detti **antigeni minori di istocompatibilità**, possono causare reazioni di rigetto deboli o più lente mediante il meccanismo classico di processazione e presentazione ai linf T da parte di APC. Il ruolo degli antigeni minori non è ben noto.

Gli **alloantigeni** possono essere riconosciuti dai linf T per via diretta, cioè MHC intatte e non processate, oppure per via indiretta, cioè MHC processate dalle APC ed esposte sulle proprie MHC. 1- **Via diretta**: il repertorio di linf T maturi è caratterizzato da una bassa affinità intrinseca per l'MHC self e include casualmente molte **cellule T che legano MHC allogenici con alta affinità**. I peptidi che si legano all'MHC possono contribuire al riconoscimento oppure no. La via diretta è formalmente la cross-reattività di alcuni linf T verso MHC estranei. Le risposte che seguono il riconoscimento diretto sono molto forti perché vengono attivati tantissimi linf T (l'1-2% del totale, 100 – 1000 volte più di una risposta comune): ogni complesso MHC-peptide stimola un TCR diverso, ogni APC espone migliaia di MHC tutte potenzialmente immunogene, tra i linf T cross reattivi per MHC molti sono linf T della memoria. Probabilmente la via diretta è la principale. 2- **Via indiretta**: **le MHC del donatore sono catturate e processate dalle APC** come qualsiasi antigene proteico non self, generando moltissimi peptidi immunogeni. I peptidi sono presentati su MHC II a linf T CD4+, oppure cross-presentati su MHC I a linf T CD8+. Probabilmente il rigetto acuto è l'effetto dei linf T CD8+, mentre il rigetto cronico è l'effetto dei linf T CD4+.

Le APC del donatore migrano ai linfonodi drenanti il trapianto e permettono il riconoscimento diretto, mentre le APC del ricevente possono migrare nel trapianto, captare e processare alloantigeni per il riconoscimento indiretto. L'**infiammazione** induce lo sviluppo di nuove vie linfatiche tra trapianto e organismo. La proliferazione e il differenziamento dei linf T in cellule effettrici è detta **sensibilizzazione agli alloantigeni**. I linf T memoria possono migrare direttamente nel trapianto e svolgere funzione effettrice senza bisogno di attivazione APC-dipendente. La **costimolazione da parte di B7** espresso dalle APC è fondamentale per il rigetto: durante il danno da ischemia alcune cellule muoiono e rilasciano DAMP che vengono recepiti dalle APC. La risposta alloreattiva dei linfociti T verso molecole MHC può essere studiata in vitro attraverso una reazione linfocitaria mista nella quale i linfociti di due individui diversi sono co-coltivati in vitro. Le cellule di

ciascun individuo si attivano in risposta al reciproco riconoscimento di MHC estraneo. Questa reazione (reazione linfocitaria mista) era usata per predire il grado di compatibilità tra un possibile donatore e un possibile ricevente. Le risposte agli alloantigeni sono le uniche risposte primarie visibili, perché le risposte primarie ad altri antigeni non self sono troppo deboli.

I meccanismi effettori sono l'**infiammazione mediata da citochine prodotte da linf CD4+ helper** (identica all'ipersensibilità ritardata) e l'**uccisione di cellule del trapianto da parte di linf T CD8+** attivati per riconoscimento diretto (e non ristretti per MHC self). Le cellule effettrici collaborano con le APC dell'ospite infiltrate nel trapianto. Anche i linf B naive possono riconoscere MHC allogeniche, internalizzarle e presentarle a linf T attivati contro gli stessi antigeni dalle DC. Si realizza quindi la maturazione classica dei linf B contro MHC allogenici e la **produzione di anticorpi** che infiltrano e danneggiano il rigetto, soprattutto a livello dei vasi del trapianto.

Il rigetto del trapianto è classificato in base alle caratteristiche istopatologiche, prendendo il rene come riferimento. 1- **Rigetto iperacuto**: anticorpi naturali preesistenti al trapianto (IgM contro carboidrati e IgG contro proteine) legano alloantigeni dell'endotelio, attivando il complemento e i fattori di coagulazione e causando quindi trombosi e occlusione dei vasi. Entro pochi minuti o ore il trapianto va incontro a necrosi ischemica. Gli anticorpi naturali (IgG) possono derivare da una precedente esposizione (trasfusione, trapianto, gravidanze). Gli antigeni ABO espressi dall'endotelio (IgM) sono noti, quindi generalmente non costituiscono un problema. 2- **Rigetto acuto**: si manifesta nei giorni e nelle settimane successivi al trapianto, il tempo necessario allo sviluppo della risposta. I meccanismi cellulari sono l'infiammazione indotta da linf T helper e la morte di cellule endoteliali e parenchimali indotta da linf T citotossici. I meccanismi umorali sono il legame di anticorpi alle HLA dell'endotelio, l'attivazione locale del complemento, la trombosi intravascolare e la morte endoteliale. 3- **Rigetto cronico**: può verificarsi dopo mesi o anni dal trapianto, in seguito a rigetto acuto oppure no. Sotto lo stimolo di linf T helper l'organo subisce proliferazione delle cellule muscolari lisce dei vasi, occlusione delle arterie e danno ischemico (vasculopatia del trapianto), mentre il parenchima danneggiato viene sostituito da tessuto fibroso non funzionale, perdendo la propria funzionalità. Il rigetto cronico non è controllabile con farmaci immunosoppressivi. 4- **Rigetto del feto**: Il feto non viene rigettato dalla madre perché il feto produce MHC che non sono riconosciuti come allogenici e che sono in grado di inibire le NK materne, produce TGF, ci sono linf Treg e citochine immunosoppressive.

Prevenzione del rigetto: **ridurre al minimo la differenza genetica tra donatore e ricevente**: tipizzazione ABO (per evitare rigetto iperacuto), tipizzazione tissutale degli alleli HLA (da 0 a 6 mismatch per i 6 alleli, l'analisi è effettuata mediante PCR) e cross-matching per trovare anticorpi preformati per MHC o altri antigeni (siero del ricevente e cellule del donatore). Per alcuni organi come il fegato non si ricerca la compatibilità MHC perché non è possibile tenere in vita un paziente bisognoso e l'organo deperisce in fretta. **Trattamento del rigetto**: l'unica soluzione ora è indurre un'**immunosoppressione generalizzata**, ma si punta ad una immunosoppressione specifica che non abbassa tutte le difese dell'ospite. Si usano molecole che inibiscono o uccidono i linf T: ciclosporina (peptide fungino che inibisce l'attività enzimatica della calcineurina necessaria per indurre il fattore di trascrizione NFAT. Quindi la ciclosporina inibisce la trascrizione dei geni dell'IL-2 e di altre citochine) e FK506 inibiscono l'espressione di alcuni geni (citochine…); la rapamicina inibisce la trasduzione del segnale per la proliferazione dei linf T e ha effetto anche su DC e linf B, mentre non danneggia i linf T regolatori; citostatici specifici (come mofetil micofenolato) uccidono i linf T proliferanti e le cellule T mature; anticorpi chimerici umanizzati, monoclonali e policlonali, diretti contro le proteine di membrana dei linf T (CD3 e CD25) possono neutralizzarli o ucciderli (complemento + fagocitosi); alcuni composti bloccano le vie di costimolazione (CTLA4-Ig lega e sequestra il B7, anticorpo anti-CD40L); plasmaferesi (rimozione degli anticorpi circolanti), intravenous immune globulin (iniezione di IgG) ed eliminazione dei linf B riducono il rischio di rigetto tramite immunità umorale; i farmaci antiinfiammatori (soprattutto corticosteroidi) inibiscono la produzione di citochine e mediatori dell'infiammazione. L'immunosoppressione prolungata

causa un aumento della suscettibilità a infezioni intracellulari (soprattutto virali) e a tumori maligni (associati a virus), inoltre l'uso di questi farmaci può avere una propria tossicità diretta sulle cellule.

[L'**induzione della tolleranza agli alloantigeni** implica la mancata risposta al trapianto anche in assenza di farmaci immunosoppressivi. Coinvolge gli stessi meccanismi della tolleranza al self, evita i problemi dell'immunosoppressione aspecifica e riduce il rigetto cronico. La tolleranza si può realizzare tramite trasfusioni precedenti al trapianto (introduzione di leucociti allogenici o DC immature) e chimerismo ematopoietico (loro sopravvivenza a lungo termine nell'ospite), blocco della costimolazione, trasferimento o induzione di cellule T regolatorie. Il trapianto xenogenico fallisce a causa di anticorpi naturali contro gli xenoantigeni, che causano rigetto iperacuto o più raramente rigetto ritardato (equivalente dell'acuto) o risposte T. Per ragioni anatomiche, i maiali sono la specie di elezione per la donazione all'uomo.]

La tipizzazione HLA viene eseguita facendo reagire con una serie di sieri, ciascuno dei quali può riconoscere quel dato HLA, ma differisce dagli altri per le altre specificità riconosciute

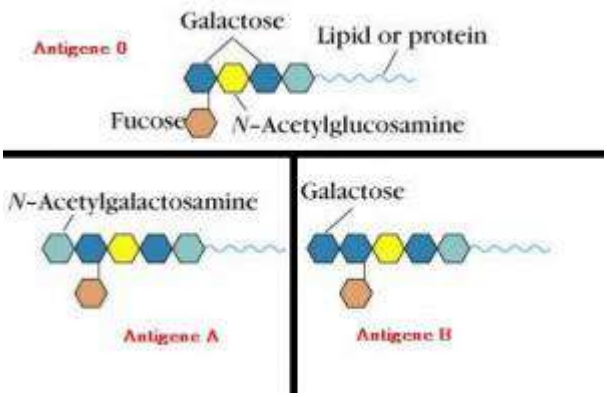
Trapianto di cellule staminali ematopoietiche pluripotenti, per il trattamento di leucemie. Prima si aspiravano cellule del midollo osseo, ora se ne stimola la mobilizzazione con fattori di stimolazione delle colonie e si prelevano HSC dal sangue. Nel ricevente si uccidono le cellule midollari per liberare nicchie necessarie alle HSC. **Donatore e ricevente devono condividere tutti i loci MHC**, perché il rigetto delle HSC coinvolge anche le **cellule NK**, che uccidono tutte le cellule senza MHC I self. Vale quindi la resistenza dell'ibrido all'attecchimento del midollo osseo parentale. La reazione più grave è la **GVHD reazione del trapianto contro l'ospite**, causata dai linf T maturi dell'inoculo contro alloantigeni minori dell'ospite. Nella GVHD acuta si ha morte delle cellule epiteliali della cute, del fegato e del tratto gastrointestinale, mentre nella GVHD cronica si ha fibrosi e atrofia degli stessi, senza morte cellulare acuta. La GVHD è innescata da linf T trapiantati, ma ci sono anche altre cellule effettrici. Inoltre il trapianto è spesso seguito da **immunodeficienza**, forse causata dalla morte di cellule immunitarie dovuta a irradiazione e chemioterapia. C'è interesse nell'uso di cellule staminali pluripotenti per la riparazione di tessuti dotati di limitata capacità rigenerativa (muscolo cardiaco, cervello, midollo spinale). Usare cellule pluripotenti derivate dallo sdifferenziamento di cellule tissutali somatiche aggirerebbe il problema del rigetto. I trapianti multiorgano hanno un tasso di successo maggiore perché in presenza di enormi quantità di alloantigeni si innescano più facilmente fenomeni di tolleranza. Nel caso delle leucemie si un tasso di sopravvivenza maggiore con un trapianto di midollo allogenico: la reazione contro le cellule tumorali è più potente rispetto a quelle del midollo autologo.

GRUPPI SANGUIGNI

La trasfusione è il trasferimento di sangue intero o cellule del sangue per via endovenosa, per ripristinare il volume ematico o per correggere anomalie cellulari. Le reazioni trasfusionali possono essere letali, in quanto causano lisi e fagocitosi dei globuli rossi, insufficienza renale, shock e coagulazione intravascolare. I **sistemi di antigeni gruppo-ematici** sono un insieme di antigeni codificati da geni allelici appartenenti a un singolo locus ed ereditati separatamente dagli altri geni. Il **sistema ABO** è costituito da antigeni espressi su tutte le cellule e da **anticorpi naturali IgM** che presentano cross-reattività contro quegli antigeni. Probabilmente la presenza di un antigene induce la tolleranza a quell'antigene, impedendo di sviluppare anticorpi autoimmuni.

Le emorragie post traumatiche e post parto sono state trattate prima con trasfusioni con sangue animale (morte certa) e poi con sangue umano (sopravvivenza in certi casi). Oggi si usano plasma expanders che mantengono costante il volume del plasma e la pressione oncotica. Landstainer raccoglie campioni di sangue e li divide in siero e componenti corpuscolati e ne studia l'**agglutinazione**. Deduce l'esistenza di **tre gruppi**: **A, B e O**. A e B sono caratterizzati dalla presenza di **agglutinogeno (antigene A o B)** sulla superficie dei globuli rossi. Se vengono in contatto con le **agglutinine (anticorpi anti A o anti B)** del siero di un altro individuo, questi globuli agglutinano e precipitano. I globuli O non precipitano mai perché sono privi di agglutinogeno,

ma hanno entrambi gli anticorpi. Esiste anche il gruppo AB con entrambi gli antigeni e senza anticorpi. Quindi AB sono ricevitori universali mentre 0 sono donatori universali. E' problematico se il ricevente agglutina il sangue del donatore, non viceversa, perché nel sangue ci sono un po' di antigeni solubili che possono intercettare e neutralizzare gli anticorpi del donatore. I globuli rossi sono ricchi di cariche negative, quindi normalmente si respingono. **Gli anticorpi** sconfiggono queste forze repulsive e **fanno avvicinare i gr**, inoltre **ne schermano le cariche negative, facendoli agglutinare.**



Tutti gli individui producono una struttura di glicano comune. La fucosiltransferasi aggiunge un fucosio (zucchero terminale), generando **l'antigene H (oligosaccaride fondamentale)**. Il cromosoma 9 contiene il gene della **glicosiltrasferasi**, di cui esistono l'allele 0 (nessuna attività), A (trasferimento di N-metil-galattosamina sul penultimo zucchero con legame alfa1-3) e B (trasferimento di galattosio sul penultimo zucchero con legame alfa1-3). E' un carattere autosomico codominante: AA/AX – BB/BX – AB – XX. Una mutazione della fucosiltrasferasi causa il **fenotipo Bombay**, in cui nemmeno l'antigene H è riconosciuto come self. **Gli anticorpi del sistema ABO derivano da linf B1, sono solo IgM**, rivolte contro alcune centinaia di strutture oligosaccaridiche batteriche, casualmente condivise da questi antigeni. In presenza dell'antigene self quel clone linfocitario viene eliminato. Ci sono polimorfismi nei geni delle gltr che determinano una variabilità antigenica: alcuni possono consumare tutta la sostanza H, quindi non riconoscono il fucosio come self, pertanto non possono ricevere sangue da gruppo O. Soggetti A2 (basso livello di antigene A) possono avere anticorpi anti-A1. Soggetti A1 e A1B possono avere deboli anticorpi anti-H(?). Glicoproteine e glicosfingolipidi con antigeni ABO sono presenti su globuli rossi, cellule endoteliali ed epiteliali, nelle secrezioni sierose e mucose. In A si distingue A1, A2, A3; in B si distingue B1 e B2. Questi antigeni sono scarsamente presenti o quasi assenti alla nascita, mentre sono massimi intorno ai 2-3 anni di età per evitare l'incompatibilità materno-fetale. Non sono prodotti come espressione della genetica del sistema AB0 ma sono anticorpi prodotti contro i batteri e nella maturazione sono soppressi i cloni che potrebbero causare autoreattività. Per questo il titolo anticorpale aumenta dopo la nascita man mano che si è esposti all'ambiente esterno. Gli anticorpi naturali: sono capaci di reagire a bassa temperatura, vengono inattivati rapidamente da antigeni solubili, vengono inattivati da 2-Me, predominano nei soggetti non immunizzati. Gli anticorpi immuni: sono incapaci di reagire a bassa temperatura, non vengono inattivati da antigeni solubili, non vengono inattivati da 2-Me, sono rari nei soggetti non immunizzati. Soggetti di gruppo A1 ed A1B possono produrre anticorpi anti H: sono comunque anticorpi deboli e non reagiscono a 37°C. Soggetti di fenotipo Bombay producono regolarmente anticorpi anti H che reagiscono a 37°C.

Il sistema ABO (glucidico) fa sviluppare IgM che non attraversano la placenta, è raro fare IgG contro il sistema ABO perché gli antigeni vengono sequestrati dalle IgM. Invece il **sistema Rh (proteico)** fa sviluppare **IgG**, che attraversano la placenta. Una donna Rh- alla prima gravidanza con un figlio Rh+ entra in contatto con il sangue fetale, si immunizza, produce prima IgM e poi IgG, ma intanto il figlio è nato. Ad una seconda gravidanza il figlio Rh+ incontra subito le IgG, che opsonizzano e fanno fagocitare i globuli rossi (eritroblastosi fetale). L'eme non riciclabile viene convertito in bilirubina, che non può ancora essere solubilizzata, quindi si muove nel sangue fino a raggiungere il SNC, dove danneggia gravemente i nuclei della base. In realtà raramente dopo il primo parto si ha un'immunizzazione tale da essere letale per il secondo figlio, quindi l'Rh non scompare. La reazione può essere prevenuta somministrando anticorpi anti-RhD entro 3 giorni dalla nascita del primo figlio. Il nome Rh deriva dal fatto che i globuli rossi Rh+ vengono agglutinati dal siero di coniglio immunizzato con globuli rossi di Macacus Rhesus, per cross reattività. Rh- può ricevere Rh+ per una volta, perché non è ancora immunizzato. Il sistema Rh ha tre coppie antigeniche di alleli codominanti E/e, C/c, D/assenza di d. **Solo D è altamente immunogeno** (il più immunogeno dei sistemi gruppo-ematici), quindi

il fattore Rh corrisponde a D. **Delezioni o alterazioni del gene D (15% degli individui) rendono l'individuo Rh negativo**, quindi intollerante alla proteina di membrana Rh.

Operando tante trasfusioni ripetute sono stati scoperti anche altri gruppi sanguigni. **Ogni nuova trasfusione immunizza il ricevente contro gli antigeni del donatore**. Per tutti gli antigeni si sviluppa l'anticorpo solo venendo in contatto con l'antigene, mentre per il sistema ABO ci sono già gli anticorpi. A parte i sistemi ABO e Rh gli altri difficilmente danno problemi, a meno di trasfusioni ripetute, perché sono scarsamente immunogeni. Alcuni sistemi sono **glucidici** (ABO, Lewis, P), altri **proteici** (Rh, MNSs). Il sistema Lewis è generato dall'azione di differenti fucosiltrasferasi sugli antigeni ABO (può dare luogo a Le^a, Le^b, Le^x, Le^y). Il sistema MNSs è costituito da antigeni M e N su glicoforina A, e S e U su glicoforina B. La glicoforina A determina gli antigeni M ed N a seconda del primo e del quinto residuo amminoacidico della porzione extracellulare: serina e glicina danno antigene M, leucina ed acido glutammico danno antigene N. Si possono generare IgG contro questi antigeni, causando malattia emolitica del neonato. La glicoforina B determina le attività S, s ed U. La glicoforina B può avere antigeni S o s, ma in sua assenza manca non solo la coppia Ss, ma anche l'antigene U. Gli antigeni minori possono causare reazioni tardive, in cui si ha una progressiva perdita dei globuli rossi trasfusi. Comunque prima di ogni trasfusione si fanno le prove crociate per evitare problemi. Per capire contro quale antigene il ricevente sta sviluppando l'immunità si fanno delle prove con globuli rossi tipizzati e si cerca l'antigene comune a tutti quelli che vengono agglutinati.

Tecniche di determinazione dei gruppi sanguigni: 1- **test di agglutinazione** su vetrino. 2- test in provetta per l'identificazione di anticorpi nel siero (mancata risospensione o emolisi). 3- adesione su fase solida. 4- agglutinazione su colonna. AGGLUTINAZIONE: La velocità di eritrosedimentazione è la velocità con cui i globuli rossi tendono a sedimentare in un campione con anticoagulante, quella normale è 4-5ml/h. Durante una malattia la VES aumenta perché aumentano le globuline. Le IgM fanno coagulare meglio delle IgG perché quest'ultime sono troppo piccole per formare dei ponti fra eritrociti. **Fattori che influenzano l'agglutinazione**: carica superficiale delle cellule, posizione degli antigeni e mezzo in cui avviene la reazione (temperatura, pH, forza ionica, rapporto stechiometrico Ab/Ag). Si può favorire l'agglutinazione aggiungendo albumina o polimeri carichi positivamente, o polietilenglicole, oppure digerendo le superfici cellulari. **Test di Coomb**: Il test di Coombs diretto permette di determinare la presenza di autoanticorpi (auto-Ab) adesi alla superficie degli eritrociti. Il test viene eseguito cimentando il sangue intero del paziente con il siero di Coombs (siero di coniglio con Ab anti-autoanticorpi). Nel caso in cui siano presenti auto-Ab adesi alla membrana dei globuli rossi, gli anticorpi presenti nel siero di Coombs creerebbero dei legami a ponte responsabili dell'agglutinazione dei globuli rossi e formazione di precipitato (test di Coombs diretto positivo); in caso in cui non fossero presenti, il campione non subirebbe alcuna modifica (test di Coombs diretto negativo). Il test di Coombs diretto è utilizzato nella diagnosi di MEA (Malattie emolitiche autoimmuni), MEN (Malattia emolitica del neonato) e per la visualizzazione delle reazioni trasfusionali. Il test di Coombs indiretto permette di determinare la presenza di anticorpi anti-eritrocitari liberi nel plasma. Il test viene eseguito cimentando il siero del paziente (ricevente) con gli eritrociti (donatore) contro cui si vuole ricercare la presenza di anticorpi; in seguito, si aggiunge il siero di Coombs. Nel caso in cui siano presenti anticorpi anti-eritrocitari nel siero cimentato con i globuli rossi si verranno a formare complessi antigene-anticorpo sulle membrane degli eritrociti che, legati a loro volta dagli anticorpi del siero di Coombs, determineranno agglutinazione (test di Coombs indiretto positivo); in caso in cui non vi sia reazione tra gli anticorpi del siero e gli antigeni dei globuli rossi, non si verificherà alcun cambiamento all'interno della provetta in cui questi sono cimentati (test di Coombs indiretto negativo). Il test di Coombs indiretto è utilizzato nella ricerca di compatibilità donatore/ricevente nel caso di emotrasfusioni. Cause di errore sono la presenza di globuline. I sieri di Coombs possono essere monospecifici (possedere Ab contro o IgG o C3b-C3-d) o polispecifici. Problemi di prozona e postzona possono essere rimediati con usando le giuste proporzioni: 1 drop of 2-5% suspension with 1-2 drops serum

SEGNALI CHIMICI - CITOCHINE

Le citochine sono responsabili della differenziazione e della modulazione della maggior parte delle cellule della risposta immunitaria. Hanno **azione autocrina e paracrina**. Eventi di metilazione del DNA del linfocita determinano il cambio del pattern di citochine prodotte.

Funzioni delle citochine:

- **Infiammazione** dei tessuti
- **Crescita e differenziazione di tutte le cellule del sistema immunitario**
- Attivazione delle **funzioni effettrici di linfociti e fagociti**
- Migrazione cellulare (**chemiotassi**)
- **Inibizione della replicazione virale**

Le **chemochine** (circa 50 note) sono polipeptidi di 8-10 kDa con 2 ponti disolfuro, catalogati, in base al numero e alla posizione delle cisteine N-terminali, in **CC e CXC** (esistono anche C e CX_3C). I neutrofili recepiscono le CXC, i monociti le CC, i linfociti entrambe, grazie a **recettori associati a proteine G** (recettori a 7 domini transmembrana). Operano 1- reclutamento dei leucociti circolanti ai siti extravascolari, legandosi all'endotelio delle venule post-capillari e guidando i leucociti per **chemiotassi**. 2- sviluppo degli organi linfoidi. 3- migrazione delle cell dendritiche dai focolai d'infezione alla zona T dei linfonodi, grazie al recettore CCR7, espresso in seguito al contatto con l'antigene.

Interleuchine:

- **IL-1**: IL **proinfiammatoria** prodotta da fagociti mononucleati, neutrofili e cellule epiteliali, si lega a recettori su cellule endoteliali, epiteliali (più molecole di adesione) e leucociti causando risposte simili a quelle mediate da TLR. Induce la febbre attraverso l'ipotalamo e stimola il fegato a produrre proteine di fase acuta.
- **IL-2**, detta **fattore di crescita dei linfociti T**: glicoproteina globulare di circa 15 kDa costituita da 4 alfa-eliche (citochine di tipo I). Secreta dai linf T stessi a livello della sinapsi immunologica con una APC, ha azione autocrina e paracrina. La produzione inizia dopo 1-2 ore dall'attivazione, ha picco a 8-12 ore e si esaurisce entro 24 ore. Ha vari effetti: induce la proteina antiapoptotica Bcl-2, stimola la sintesi di cicline (fattori del ciclo cellulare) e causa la degradazione di p27 (inibitore del ciclo cellulare), aumenta la produzione di citochine effettrici, è assolutamente essenziale per la sopravvivenza dei linf T regolatori ed è fondamentale per la proliferazione e il differenziamento di linf T, B e NK.
  Il recettore è costituito da 3 proteine associate in modo non covalente, che possono legare IL-2 separatamente oppure come trimero, con altissima affinità (kd = 10^-11). Solo IL-2Rα (CD25) è specifico per IL-2, le catene β e γ sono condivise con altri recettori per IL. Il trimero può reagire a [IL-2] bassissime. Linf T naive e effettori esprimono IL-2R in modo transitorio subito dopo l'attivazione, mentre i linf T regolatori esprimono il recettore in maniera costitutiva. La stimolazione cronica dei linf T determina lo shedding, cioè la rimozione del recettore dalla superficie cellulare.
- **IL-4**: citochina di tipo I, induttore ed effettore della **risposta di tipo T_H2**. Nei linf B induce lo switch isotipico verso le IgE e alcuni tipi di IgG, insieme a IL13 causa attivazione alternativa dei macrofagi (inibizione delle risposte contro microbi intracellulari), difese contro patogeni sulla superficie epiteliale (peristalsi del tratto gastro-intestinale e secrezione di muco da parte delle cellule epiteliali), reclutamento degli eosinofili.
- **IL-5**: citochina di tipo I prodotta da linf T_H2 e mastociti attivati, induce la proliferazione, la differenziazione e l'**attivazione degli eosinofili**. Gli eosinofili attivi esprimono il recettore per l'Fc di IgE e alcune IgG, quindi possono rispondere a patogeni opsonizzati. IL-5 inoltre induce la proliferazione dei linf B e la produzione di IgA.
- IL-6: ha effetti sia locali che sistemici, regola la produzione di mediatori infiammatori a livello epatico, la produzione di neutrofili e la differenziazione di linf T helper

- IL-7: citochina necessaria per la sopravvivenza dei linf T naive
- **IL-10**: **modula l'infiammazione per evitare danni ai tessuti**. Il recettore delle citochine è di tipo II. E' prodotta da macrofagi attivati, linf T reg, T_H1, T_H2, e linf B "regolatori". Inibisce, su macrofagi attivati e DC (feedback negativo) la produzione di molecole costimolatorie, MHC II e IL-12 (necessario per la produzione di IFN). E' fondamentale nella modulazione della risposta a livello delle mucose (soprattutto nel tratto gastrointestinale).
- **IL-13**: citochina di tipo I, presenta una certa omologia strutturale con IL-4. E' prodotta da linf T_H2, basofili, eosinofili e cellule NKT, possiede recettori su quasi tutte le cellule immunitarie tranne i linf T. **Insieme a IL4** causa attivazione alternativa dei macrofagi (inibizione delle risposte contro microbi intracellulari), difese contro patogeni sulla superficie epiteliale (peristalsi del tratto gastro-intestinale e secrezione di muco da parte delle cellule epiteliali), reclutamento degli eosinofili. Contribuisce alla **riparazione dei tessuti e alla fibrosi**.
- **IL-17**: citochina e recettore (complesso multimerico) sono atipici, cioè con poca omologia con le altre molecole. Sono 6 citochine correlate, **espresse da linf T_H17**. IL-17 stimola la proliferazione (fattore stimolante la crescita di colonie di granulociti) e la migrazione (chemochine e TGF) dei **neutrofili al sito di infiammazione**, inoltre induce vari tipi cellulari a produrre sostanze antimicrobiche.
- **IL-21**: citochina di tipo I coinvolta nella generazione di linf T helper follicolari e stimolazione di linf B, **proliferazione e differenziamento di linf** T CD8+ citotossici e cellule NK. E' responsabile della differenziazione T_H17.
- **IL-22**: citochina di tipo II prodotta nei tessuti epiteliali, mantiene l'integrità e le **funzioni di barriera degli epiteli** e contribuisce all'infiammazione e al richiamo di cellule per la risposta.

TGF-β Tumor growing factor, o fattore di crescita trasformante β: identificato come proteina capace di favorire la sopravvivenza del tumore, esiste in forma 1, 2 e 3. **I linf T reg secernono TGF-β1 in forma inattiva**, che viene clivato e attivato, andando ad interagire con il recettore, regolando poi la trascrizione di alcuni geni. Il TGF inibisce la proliferazione e le funzioni effettrici dei linf T, l'attivazione classica dei macrofagi, dei neutrofili e delle cellule endoteliali. Stimola il differenziamento verso **T reg e T_H17**, mentre inibisce T_H1 e T_H2. Induce lo switch isotipico verso **IgA** e promuove la **riparazione dei tessuti** attraverso macrofagi e fibroblasti.

Interferoni di tipo 1: **inibiscono la replicazione virale**, sono secreti da cellule con PRR, come le cellule dendritiche plasmacitoidi (IFN-α) e altri citotipi (INF-β). Gli acidi nucleici virali sono il più potente stimolatore della sintesi di IFN, che si lega ad un recettore eterodimerico espresso in maniera ubiquitaria. L'IFN conferisce uno stato di resistenza antivirale tramite **degradazione dell'RNA virale**, in maniera autocrina e paracrina, ma anche **danneggiando le cellule vicine a quella infetta**, limitando la diffusione del virus. L'IFN riduce l'espressione del recettore dei linf per la sfingosina-1-fosfato, quindi ne aumenta il tempo di permanenza nei linfonodi. Aumenta inoltre la **produzione di MHC I** per l'esposizione di peptidi virali e aumenta la capacità citotossica di cellule NK e linf T CD8+, e stimola il differenziamento T_H1. Infine aumenta la sensibilità della cellula agli stimoli proapoptotici intrinseci (proteine virali) ed estrinseci (TNF).

Interferoni immunitari di tipo 2, INFγ: E' un mediatore dell'immunità innata prodotto da linfociti T CD8+ citotossici e T CD4+ helper di tipo T_H1 e da cellule natural killer. Omodimero appartenente alle citochine di tipo II, dotata di modesta attività antivirale e spiccata capacità di **attivazione classica dei macrofagi** (aumento dell'attività fagocitica). E' coadiuvato dai Toll-like receptors nella risposta innata, dal CD40 ligando nella risposta adattativa. I T helper follicolari producono IFN che induce lo **switch isotipico verso forme di IgG** capaci di legarsi ai recettori per Fc dei fagociti e di attivare il complemento, meccanismi che facilitano la fagocitosi di patogeni opsonizzati. E' responsabile del **differenziamento di tipo T_H1**. Inoltre induce tutte le proteine necessarie al miglioramento della presentazione dell'antigene. Il recettore è composto da due catene polipeptidiche omologhe che dimerizzano quando legano IFN, attivando una via di trasduzione.

Tumor necrosis factor TNF: così denominato per la sua capacità di causare la necrosi dei tumori, è prodotto in risposta a PAMP e DAMP da macrofagi, cellule dendritiche e altri citotipi come proteina di membrana, poi

clivato e rilasciato. Circola come **piramide a base triangolare** e può legare diversi tipi di **recettori trimerici** espressi su quasi tutte le cellule, causando trascrizione genica o apoptosi. La trasduzione del segnale è atipica, perché avviene per cambiamento conformazionale del recettore. Insieme a IL-1 e IL-6 stimola la produzione di chemochine, di selectine, il richiamo di leucociti e la produzione di neutrofili. **BAFF è il B-cell activating factor of TNF family**. Induce la febbre tramite l'ipotalamo, attiva l'endotelio e stimola tessuti e organi a rispondere all'infezione. Agisce sul fegato e sul metabolismo di tessuto adiposo e muscolare, causando una perdita di peso. La CD154, anche chiamata **CD40 ligando** o semplicemente CD40L, è una proteina espressa soprattutto nei linfociti T attivati e facente parte della superfamiglia del TNF. Si lega al CD40 presente sulle antigen-presenting cell (APC) agendo come co-attivatore. In particolare, il legame CD40/CD40L attiva i linfociti B stimolandoli a formare i centri germinativi, porta le cellule dendritiche ad aumentare la produzione di molecole stimolatorie e citochine (licensing delle cellule dendritiche), e aumenta l'attività microbicida dei macrofagi.

RECETTORI PER LE CITOCHINE

- **Recettori per le citochine di tipo I**: dimeri o trimeri in cui una catena riconosce una citochina con 4 alfa eliche e una catena trasduce il segnale. Hanno residui conservati di cisteina e motivo WSXWS. La trasduzione coinvolge chinasi Janus JAK e Signal transducers and activators of transcription STAT.
- **Recettori per le citochine di tipo II**: come i recettori di tipo uno, ma senza motivo WSXWS.
- **Famiglia del recettore per il TNF**: appartiene ad una famiglia di recettori trimerici non esclusivi per le citochine, i cui ligandi (solubili o di membrana), sono anch'essi trimerici e determinano un cambiamento conformazionale nel recettore. La trasduzione può stimolare l'espressione genica o indurre apoptosi.
- **Famiglia dell'IL1**: i recettori possiedono un dominio citoplasmatico conservato detto TIR (Toll-like IL1 receptor). Questi recettori dimerizzano e con una complessa cascata di segnalazione attivano una E3 ligasi che porta all'attivazione di NF-kB. NF-kB è un fattore di trascrizione fondamentale per l'infiammazione, l'attivazione linfocitaria, la sopravvivenza cellulare e la formazione degli organi linfoidi secondari.

IMMUNOLOGIA E LA GIOIA DI VIVERE

Allergie

- Durante la risposta T_H2 Il parassita è localizzato, quindi anche l'infiammazione che si sviluppa. Un allergene invece viene ingerito o respirato, va in circolo e attiva la risposta immunitaria in tutto il corpo. L'allergene causa degranulazione dei mastociti, che causano vasodilatazione. L'effetto è detto ipersensibilità immediata. Nello shock anafilattico tutti i capillari (V = 90 litri) si aprono, tutto il sangue (5 litri) esce e non riesce più a rientrare nelle venule. Il sangue può diffondere per circa 100 micron. Per trattare l'allergia si somministrano antigeni con adiuvanti della risposta T_H1, che causa la fagocitosi dell'allergene, rendendo innocue le IgE dell'infiammazione.
- Nell'asma bronchiale l'istamina liberata agisce da vasodilatatore e da broncocostrittore, quindi si ha costrizione del bronchiolo, inspessimento della mucosa (edema) e aumento del muco.
- Ambiente cittadino con aria inquinata → microambiente ossidante → produzione di IgE da infiammazione → microambiente favorevole allo sviluppo di allergie (es. ai pollini e alla polvere)

Risposte incontrollate

- Nello shock asettico una gran quantità di antigene (es. LPS liberato da un batterio trattato con antibiotico) può iperattivare i linfociti, che uccidono l'organismo.

- Il recettore scavenger CD36 riconosce alcuni lipidi dei microbi. Se ci sono tante LDL alcune attraversano le pareti dei vasi e si ossidano, attivando CD36, che richiama i macrofagi. Le LDL ossidate però fanno lisare i macrofagi, scatenando un feedback che genera una placca arteriosclerotica. Quando questa si rompe viaggia nei vasi e li può occludere, causando un ictus.
- Infezione cronica: equilibrio patogeno-tessuto non previsto dal sistema immunitario. Il patogeno causa solo un danno modesto alle cellule infettate, che però vengono uccise dal sistema immunitario, quindi si ha infiammazione continua e il tessuto viene sostituito da connettivo.

Malnutrizione → calo della sintesi proteica → poche Ig → infezioni

Tumori

- Mieloma multiplo: produzione incontrollata di Ig e mutazione delle CDR che porta al riconoscimento dell'epitelio → ostruzione dei tubuli renali e morte.
- Leucemia: tumore del sistema immunitario che blocca il differenziamento dei linfociti e ne stimola la riproduzione nello stadio raggiunto. La leucemia acuta si ha con linf poco differenziati, si manifesta rapidamente ed è facilmente trattabile. La leucemia cronica si ha con linf già abbastanza differenziati, si evolve lentamente ed è molto resistente.
- Un certo tumore causa una sovraproduzione di catene λ che si accumulano nel sangue e nei tessuti causando amiloidosi.

TECNICHE IMMUNOLOGICHE

CARATTERIZZAZIONE DI UN ANTICORPO. Lo studio dell'affinità definisce la forza complessiva di tutte le interazioni non covalenti tra antigene e anticorpo per un singolo epitopo. E' la composizione della velocità di associazione (on rate) e di dissociazione (off rate) che dipendono dalla costante di associazione (ka = [AgAb]/[Ag][Ab]) e di dissociazione (kd = 1/ka). Fattori che influenzano il legame antigene - anticorpo: temperatura, pH, forza ionica, tempo di incubazione, rapporto stechiometrico Ag/Ab. Il **limit of detection** (sensibilità dei saggi, cioè il valore minimo misurato) varia molto in base al tipo di dosaggio: ring test, immunodiffusione doppia ed immunoelettroforesi (20-200 µg/ml), immunodiffusione singola (10-50 µg/ml), agglutinazione diretta (0,3 µg/ml), agglutinazione passiva (0,5-5 ng/ml), ELISA E RIA (0,5 ng/ml)

1- **Dialisi all'equilibrio**: l'antigene marcato radioattivamente può diffondere attraverso una membrana semipermeabile, mentre l'Ab è confinato e sequestra l'antigene. Alla fine [Ag libero in] = [Ag libero out], quello che manca è stato legato dall'Ab. La concentrazione di Ag all'interno della membrana che eccede quella all'esterno dipende solo dalla formazione di complessi Ag-Ab. Grafico di Scatchard ([AgAb] ; [AgAb]/[Ag]): in una dialisi all'equilibrio, si mantiene costante la concentrazione di Ab, mentre si aumenta progressivamente la concentrazione di Ag. La pendenza della retta (a pendenza negativa) esprime la costante di dissociazione, l'intercetta sull'asse delle X esprime la valenza dell'anticorpo.
2- **Se [Ag] = [Ab] si formano dei precipitati macroscopici**. Costruendo un grafico ([Ag]; precipitato) si ottiene la curva di Heidelberger-Kendall. La curva è caratterizzata da un massimo, il cui intorno è la zona di equivalenza e una zona di eccesso di anticorpi e una di eccesso di antigeni (pochi antigeni sono condivisi da più di un anticorpo). Per trovare la **zona di equivalenza** si genera un gradiente incrociato di Ag e Ab, in cui c'è anche la zona di equivalenza, la quale richiama Ag e Ab man mano che questi si legano, precipitando. Alla fine si vede una banda di precipitato.
    - **Immunoprecipitazione singola (Test di Mancini):** uno strato di agar fuso contenente l'anticorpo + un pozzetto di soluzione con l'antigene al centro → si forma un cerchio di diametro proporzionale alla [Ag] nel pozzetto. Il cerchio si allarga nel tempo, quindi si fa una curva di calibrazione a tempo dato (48 ore). Metodo quantitativo.

- **Immunoprecipitazione doppia (Test di Outcherlony):** mettendo Ab e Ag in due pozzetti si genera una banda di precipitato nel mezzo. Per sapere se una soluzione contiene l'antigene o un target cross-reattivo si usano tre pozzetti, contenenti Ab, Ag e soluzione ignota. Se contiene Ag si osserva una banda curva unica tra Ab e gli altri due. Se contiene un cross-reattivo si osservano due bande dritte distinte tra Ab e ciascuno dei due. Se contiene entrambi si formano la banda curva più una banda dritta. Metodo qualitativo.
- **Immunoprecipitazione in fase fluida**: mettendo a contatto due fasi contenenti una Ab e l'altra Ag, si forma una banda di precipitato all'interfaccia tra le fasi.

3- **Blot**: si immobilizza Ag su un filtro di nitrocellulosa, che lega le proteine con altissima affinità. Si deposita la soluzione sul filtro, quindi Ag vi si lega. Si saturano tutti i siti di legame con un'altra proteina (albumina, latte). Si mette l'anticorpo primario (topo, coniglio) contro Ag. Si mette l'anticorpo secondario (capra) contro l'Fc del primario. Questo è marcato radioattivamente o con un enzima (fosfatasi alcalina, perossidasi, che trasformano un substrato solubile e incolore in un prodotto precipitato e colorato). Tra un passaggio e l'altro si eseguono dei lavaggi. L'enzima si "seppellisce" sotto al suo stesso prodotto, quindi la tecnica è semi-quantitativa. I vantaggi dell'Ab secondario sono A- disponibile a basso prezzo, B- un solo Ab marcato per tanti non marcati C- amplificazione di segnale.
   - Dot blot: si deposita la soluzione in piccoli spot sul filtro per capire in quali c'è l'antigene
   - Western blot: dopo elettroforesi con SDS si trasferiscono le proteine sul filtro, si rivela la banda con l'antigene e si confronta il peso molecolare. Metodo non quantitativo. Bisogna variare le condizioni per ridurre al minimo le interazioni aspecifiche.

4- **Saggi ELISA**: fanno uso di piastre di polistirene a 96 pozzetti, con affinità media per le proteine, che si legano sul fondo. L'enzima per la marcatura può generare un prodotto solubile (tanto non può diffondere) e che permette di dosare la concentrazione (legge di Lambert-Beer). Range dinamico lineare RDL: intervallo in cui il risultato della misurazione è direttamente proporzionale alla concentrazione.
   - **ELISA diretto**: bloccaggio della soluzione con proteine sul fondo, aggiunta di Ab primario e Ab secondario. Ab è a concentrazione nota e in eccesso. La sensibilità è bassa perché se [Ag] è basso pochissimi siti di legame sono occupati da esso.
   - **ELISA inverso o sandwich**: bloccaggio dell'Ab primario sul fondo, aggiunta di antigene e di Ab secondario. Fra tutte le proteine della soluzione si lega soltanto l'antigene. L'Ab secondario deve legare un epitopo molto lontano da quello dell'Ab primario. Altissima sensibilità ma basso RDL (arriva subito a saturazione). La sensibilità è inoltre diminuita dalla difficoltà di compiere lavaggi accurati (gli angoli fra fondo e pareti sono i più critici), il legame a più Ab primari nel caso di antigeni grandi e legami scorretti.

RIA= Una volta raggiunto l'equilibrio della reazione tra anticorpo, antigene marcato ed antigene non marcato, il complesso antigene –anticorpo (marcato più non marcato) viene separato dall'antigene rimasto libero e si procede alla conta della radioattività. Il rapporto B/T decresce al crescere della concentrazione di antigene non marcato.

PRODUZIONE DI ANTICORPI

ANTIGENE	Vantaggi	Svantaggi
Purificato	Perfetto per la proteina nativa	Difficoltà della purificazione instabile Rischio di denaturazione Rischio di impurità (→ cross-reattività) Protein-protein interaction
Sintetizzato	Basso costo e disponibilità illimitata	Serve un carrier

	Selettività della risposta	Il peptide scelto può non risultare immunogeno
Ricombinante	Basso costo e disponibilità illimitata. (E. coli, lievito)	Instabilità Diversità di conformazione e glicosilazione Tendenza a precipitare se prodotte in batteri

SCELTA DELL'ANTIGENE. Gli antigeni usati hanno generalmente peso superiore a 10 kDa e struttura globulare. Una parziale purificazione può essere realizzata tramite SDS-PAGE e immunoblot. Non è detto che l'anticorpo contro un peptide lineare riconosca la proteina in forma nativa. Gli epitopi possono essere continui (aa adiacenti) o discontinui (aa lontani). E' importante scegliere epitopi superficiali, idrofilici e flessibili per il riconoscimento della proteina nativa: si usano spesso C e N-terminale, a meno che siano peptidi di transito o regioni transmembrana. Per predire determinanti antigenici si usano algoritmi che prevedono la struttura della proteina. La lunghezza del peptide scelto è importante: tra 10 e 20 aa, oltre 20 aa è difficile da purificare, sotto a 10 aa l'anticorpo potrebbe essere troppo specifico per riconoscere la proteina in forma nativa.

Peptidi di piccole dimensioni non sono immunogeni, quindi devono essere **coniugati con un carrier** per stimolare la risposta. Gli anticorpi così generati possono cross-reagire con la proteina nativa. Bisogna scegliere come accoppiare il peptide al carrier (interazioni elettrostatiche tra N e C-terminale). I carrier più usati sono emacianina KLH, BSA bovina, e ovalbumina. Il carrier serve **per stimolare i linf T**, ma può indurre la produzione di anticorpi aspecifici. Per evitare l'uso di carrier è stato sviluppato il **MAP multiple antigenic peptide**, ovvero un core di 8 lisine a cui sono coniugate tante copie dell'antigene. È un sistema economico ma il peptide potrebbe essere nascosto dal resto della proteina e potrebbe non essere presentabile dalle MHC. L'**adiuvante** di Freund è un'emulsione olio in acqua con olii non metabolizzabili. Se viene aggiunto Mycobacterium tubercolosis ucciso l'adiuvante è detto completo: viene usato per la prima immunizzazione, mentre per le altre si usa quello incompleto (meno pericoloso). Si eseguono iniezioni multiple dell'antigene e test sul siero a intervalli definiti per un protocollo che può durare 2-3 mesi. Per isolare gli anticorpi si inizia prelevando il siero pre-immune da un animale. Dopo l'immunizzazione si evidenzia la presenza di anticorpi nel siero con tecniche come ELISA e dot-blot, confrontando la reattività all'antigene con il siero pre-immune. Vengono eseguite ulteriori immunizzazioni affinché l'animale generi anticorpi sempre più specifici. Gli Ab si conservano a lungo nel siero, ma se uno in particolare deve essere purificato va conservato con albumina. L'ospite deve essere geneticamente molto lontano dalla specie sorgente dell'antigene, per evitare che sia riconosciuto come self. Le specie animali usate sono topo e coniglio per Ab primari, capra per Ab secondari. Il siero si ottiene per esanguinazione completa dell'animale. Il sangue è quindi sottoposto a coagulazione, centrifugazione, inattivazione, separazione delle Ig. Trattamenti delle Ig: stabilizzazione, adsorbimento, purificazione per affinità. Si procede alla **purificazione dell'antisiero** per eliminare interazioni aspecifiche: precipitazione in solfato d'ammonio (separazione delle Ig dalle altre proteine plasmatiche), legame con proteina A o G (proteine batteriche che legano l'Fc delle IgG con affinità variabile), cromatografia per immunoaffinità (usando l'antigene legato alla colonna, rischio di denaturazione durante l'eluizione, per l'eluizione prima tampone acido glicina 2.5 e poi basico bicarbonato). Per effettuare il **controllo del titolo anticorpale** si esegue un saggio ELISA che usa l'antigene, il siero dell'animale immunizzato e un anti-siero specie-specifico. L'efficienza degli anticorpi contro proteine (in forma nativa e denaturata) è analizzata mediante ELISA, immunoprecipitazione e immunoblot.

Gli **anticorpi monoclonali** sono tutti **identici e specifici per un singolo epitopo**. Sono stati prodotti per la prima volta nel 1975. Per la produzione di anticorpi monoclonali si usano **ibridomi costituiti dalla fusione di una plasmacellula con una cellula di una linea mutante di mieloma**. Le plasmacellule sono prese dalla milza di un topo immunizzato. Si usano plasmacellule che hanno subito maturazione dell'affinità e switch isotipico verso IgG. Si usano cellule di mieloma prive del gene HGPRT (non possono usare alcuni precursori di nucleotidi) e dei geni per gli anticorpi, che possono sopravvivere in terreno HAT (aminopterina blocca la

sintesi dei nucleotidi) solo se acquisiscono il gene HGPRT. La fusione cellulare è favorita da polietilenglicole. Quindi nel terreno selettivo sopravvivono solo gli ibridomi mieloma + plasmacellula. Ibridomi generati da cellule della stessa specie sono più stabili di quelli derivati da cellule di specie diverse. I diversi cloni vengono separati e fatti proliferare in pozzetti diversi, quindi si analizza il sopranatante di ogni pozzetto per trovare gli anticorpi di interesse (ELISA, immunoprecipitation, immunoblot). Il clone scelto viene fatto proliferare per produrre stock di cellule. Alcuni ibridomi vengono immessi in un ospite, in cui cominciano a produrre abbondantemente gli anticorpi. Si usano coltura tissutale (10-100 microg/ml) oppure estrazione da ascite (raccolta di liquido sieroso nel peritoneo, fino a 10 mg/ml). Gli anticorpi monoclonali sono usati nudi o coniugati con sostanze oppure peptidi, proteine, liposomi, cellule (immunoconiugati), sono largamente impiegati nella diagnosi e nel trattamento di alcuni tumori (andando contro VEGF, TNF, …).

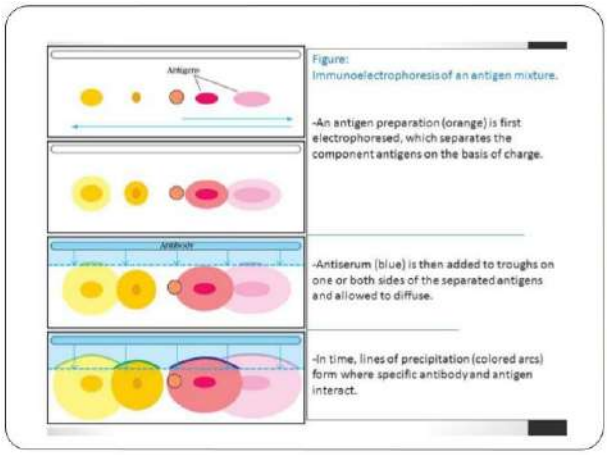
Tecniche di citometria a flusso. Negli anni '60 è stato inventato il **coulter counter.** Le cellule si trovano sospese a bassa concentrazione in una soluzione contenente elettroliti, che favorisce il passaggio di corrente. Le cellule sono fatte scorrere in un'apertura (diametro di 50-75um) presente in un isolante elettrico (come il vetro) attraverso la quale passa corrente elettrica generata da due elettrodi. Quando una cellula attraversa l'apertura, si ha un aumento di impedenza che è proporzionale al proprio volume. Perciò misurando il numero di incrementi di impedenza e la altezza dei picchi posso sapere la concentrazione dei vari tipi cellulari in una soluzione. La soluzione deve però essere sufficientemente diluita per impedire gli errori di coincidenza (due cellule piccole scambiate per una grande).

La citoflurimetria si basa sulla capacità di evidenziare la presenza di particolari antigeni sulla superficie di una cellula attraverso il legame di anticorpi che portano fluorofori. Si preferiscono fluorocromi sintetici che hanno un'elevata efficienza quantica. La cella di flusso ha due iniettori coassiali uno dentro l'altro: quello più piccolo posto all'interno contiene le cellule che vengono iniettate e che passano lentamente, mentre quello esterno ha un flusso maggiore per cui le cellule sono trascinate verso il basso formando una colonna (perché il flusso è laminare). Questa passa davanti ad un raggio laser che eccita i flurofori legati agli anticorpi. Le cellule sono sospese in un tampone fisiologico (0,9g/l di NaCl) e sono trasparenti per cui si comportano come delle lenti (superfici sferiche e densità diversa dal mezzo). Se davanti al laser passa una cellula, la luce viene rifratta e si disperde (light scatter). Il segnale di light scatter (rifrazione della luce) si divide in forward scatter, proporzionale alla dimensione/forma della particella e side scatter, dipendente dalla complessità cellulare (rugosità di membrana, rapporto citoplasma/nucleo, granuli citoplasmatici). I raggi deviati dalle cellule lungo la direzione del laser costituiscono il forward scatter, mentre quelli diffratti a 90° rispetto al laser costituiscono il side scatter. Oggi si possono vedere fino a 11 antigeni contemporaneamente (se ha CD4+, CD8+, se li ha entrambi, se ha CD3, ecc). Ci sono strumenti che hanno più laser a λ diverse per eccitare più molecole. Il segnale luminoso deve essere corretto per via delle interferenze dovute ad altri fluorocromi presenti. Posso poi analizzare separatamente le diverse popolazioni in base agli antigeni trovati (Gating). Il limite di queste tecniche è che le cellule devono essere in sospensione e per estrarle dal tessuto possono venire danneggiate. Usando la tripsina, ad esempio, si possono eliminare antigeni importanti, perciò si preferisce studiare gli antigeni direttamente sul tessuto (tecniche immunoistochimiche).

MEMORANDA

- I linfociti vergini sono linfociti T o B maturi che non hanno mai incontrato l'antigene. si trovano in circolo e negli organi linfoidi secondari. Non svolgono funzioni effettrici (idem quelli della memoria). Sono molto piccoli, caratterizzati da un nucleo grande con eterocromatina densa e un sottile anello di citoplasma con pochi organuli. Questo tipo di linfociti vive tra 1 e 3 mesi e la sopravvivenza si presume dipenda da segnali generati dai recettori per l'antigene e dalle citochine. Tra le citochine più importanti ci sono l'IL-7, che permette la sopravvivenza, il fattore di attivazione dei linfociti B, il TNF per la sopravvivenza dei Linfociti B naive.

- I linfociti effettori si hanno a seguito dell'attivazione dei linfociti vergini. Sono molecole più grandi, con un citoplasma più abbondante con un numero maggiori di organuli e una quantità maggiore di RNA citoplasmatico. Sono effettori i CD4+ helper, CD8+ citotossici, le plasmacellule. Le plasmacellule hanno un nucleo in posizione eccentrica e cromatina distribuita intorno alla membrana nucleare con una forma a ruota di carro, il citoplasma è abbondante e caratterizzato da un RE rugoso (dove vengono sintetizzati gli anticorpi), e un Golgi perinucleare.
- I linfociti della memoria sono generati durante le infezioni ma sopravvivono in quiescenza per molti anni dopo che il microorganismo è stato eliminato. Sono identificati in base all'espressione di proteine di membrana diverse rispetto agli altri tipi. Con gli anni si ha un accumulo graduale di cellule della memoria che tendono a superare in numero i linfociti vergini. I linfociti B della memoria possono esprimere diverse classi di Ig di membrana.
- La funzione effettrice nulla per i linfociti vergini e quelli della memoria (che però si attivano più facilmente). Le cellule vergini proliferano pochissimo, quelli effettori proliferano molto velocemente negli organi linfoidi (i linfonodi si ingrossano), i linfociti memoria proliferano poco. 5. i linfociti vengono riconosciuti attraverso la loro caratterizzazione immunologica della loro superficie, si chiama immunofenotipo (fenotipo della cellula definito con anticorpi monoclonali). Ogni tipo cellulare ha un CD (antigene) che identifica una particolare proteina (CD-25 identifica l'interleuchina-2). I linfociti B hanno Ig diverse: le vergini producono le IgM (pentamerici che non attraversano la placenta, quelli dei gruppi sanguigni) e IgD; quelli attivati producono IgG (opsonine), IgA (contro i batteri), IgE (alta affinità per mastociti ed eosinofili e per gli allergeni); quelli della memoria producono direttamente l'IG della classe che necessita. Al contrario dei linfociti T, quelli B hanno una caratteristica: l'ig di membrana prodotta inizialmente ha un'affinità bassa, durante l'attivazione muta il gene dell'ig per avere un'affinità maggiore e il linfocita memoria mantiene il recettore con affinità maggiore e ogni volta che incontrerà nuovamente l'antigene aumenterà l'affinità.
- (i linfociti B e T si devono incontrare in una zona, il B esce dal follicolo e il T si avvicina al follicolo, avviene l'attivazione e quindi entrambi che vedono lo stesso antigene entrano nel follicolo e vanno nel centro germinativo (prima zona scuro e poi chiaro) , quindi i B attivati escono e vanno nel midollo osseo a produrre anticorpi)
- L'immunoprecipitazione è un'elettroforesi di proteine seguita da incisione di una fessura longitudinale e riempimento di quest'ultima con antisiero per le proteine corse da evidenziare. Si formeranno archi di precipitazione dove la concentrazione di antigene e anticorpo è la medesima.



- L'agglutinazione diretta è un'agglutinazione in provetta per la ricerca di anticorpi antibatterici in un campione di siero. Si tiene in incubazione per 18-24 h a 37°C. Agitando la provetta i batteri agglutinati si sollevano in ammassi visibili ad occhio nudo.
- Agglutinazione che coinvolge antigeni solubili, o anticorpi, che sono stati legati chimicamente (o adsorbiti) a particelle insolubili, come particelle di lattice o di carbone. L'antigene, o l'anticorpo, reso in tal modo insolubile, può essere rilevato mediante agglutinazione. La particella funge da supporto inerte.
- the **precipitin ring test** (Figure 3), which is used to determine the relative amount of antigen-specific antibody in a sample of serum. To perform this test, a set of test tubes is prepared by adding an antigen solution to the bottom of each tube. Each tube receives the same volume of solution, and the concentration of antigens is constant (e.g., 1 mg/mL). Next, glycerol is added to the antigen solution in each test tube, followed by a **serial**

dilution of the antiserum. The glycerol prevents mixing of the antiserum with the antigen solution, allowing antigen-antibody binding to take place only at the interface of the two solutions. The result is a visible ring of precipitin in the tubes that have an antigen-antibody ratio within the equivalence zone.

IMMUNOCITOCHIMICA

Immunocytochemistry (ICC) is a common laboratory technique that is used to anatomically visualize the localization of a specific protein or antigen in cells by use of a specific primary antibody that binds to it. The primary antibody allows visualization of the protein under a fluorescence microscope when it is bound by a secondary antibody that has a conjugated fluorophore. ICC allows researchers to evaluate whether or not cells in a particular sample express the antigen[1] in question. In cases where an immunopositive signal is found, ICC also allows researchers to determine which sub-cellular compartments are expressing the antigen.

ISTOCHIMICA

Permette il rilevamento di antigeni, ma non il fatto che le proteine osservate siano attive. Lo spessore delle sezioni è di 5-7 micrometri.

TECNICHE ISTOLOGICHE

Il tessuto viene fissato con formaldeide in acqua, che reagisce formando dei cross link, ma modifica gli epitopi antigenici. Dopo il tessuto è passato in soluzioni acquose a concentrazioni crescenti di alcol e viene incluso in paraffina. Si usano chiarificanti come il benzolo o lo xilolo (quest'ultimo migliore perché non cancerogeno). Metto la paraffina a 60°. Il blocco è sezionabile. Devo togliere lo xilolo, poi alcol a concentrazioni decrescenti. Metto l'Ab. Se l'antigene non è visualizzabile devo ricorrere a metodi di smascheramento dell'antigene (uso del forno a microonde in cui metto un bicchiere con soluzione di fisiologica (15min): se non si stacca la sezione, la coloro e compare l'antigene . Ho tolto i legami fra le proteine tramite bollitura in tampone citrato (funziona anche con H2O). Oppure la sezione è lasciata incubare in soluzione con enzimi proteolitici aspecifici. Gli antigeni escono fuori, ma in questo lo smascheramento può far scomparire antigeni che si vedevano prima. Nella sezione di fegato non trattata si vede che il duttulo biliare del fegato ha orletto a spazzola. Smascheramento con citrato: vedo anche il citoplasma oltre che l'orletto a spazzola. Mentre lo smascheramento con proteinasi mi permette di vedere i neutrofili ma non più i duttuli biliari. In un paziente con l'epatite devo usare il tampone citrato per poter visualizzare il citoplasma colorato (Ab legano l'antigene del virus nel citoplasma).

Da qui il tessuto viene trasferito in un solvente della paraffina che di solito è lo xilolo. Esso ha la funzione di consentire la penetrazione del mezzo includente. La paraffina, il cui punto di fusione varia tra 52 e 60 °C, è usata allo stato liquido, quindi l'operazione viene praticata in termostato. Una volta che la compenetrazione è avvenuta, il pezzo viene rapidamente raffreddato, così da acquistare la consistenza della paraffina solida.

Per provvedere alla loro colorazione si suole allontanare la paraffina e riportare il tessuto al suo primitivo stato d'idratazione. Così le sezioni vengono dapprima immerse in xilolo, quindi in una serie di soluzioni di alcool a gradazione decrescente fino all'acqua.

After fixation, the tissue is dehydrated to enable embedding with paraffin, which is water-insoluble. The tissue is dehydrated gently by immersion in increasing concentrations of a dehydrating agent such as alcohol. This gradual change in hydrophobicity minimizes cell damage. The dehydrating agent is then cleared by incubation in xylene prior to paraffin embedding. Paraffin is typically heated to 60°C and then allowed to harden overnight. Finally, the tissue is sectioned using a microtome. Tissue sections may be dried by onto microscope slides and stored for extended periods at room temperature. Tissue sections are then rehydrated prior to commencing the immunostaining protocol.